

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 726**

51 Int. Cl.:

G01N 15/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2016** **PCT/EP2016/059633**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016** **WO16177641**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2016** **E 16721127 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** **EP 3292391**

54 Título: **Cribado de propiedades de nanopartículas**

30 Prioridad:

04.05.2015 EP 15166302

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

15.01.2020

73 Titular/es:

**THE EUROPEAN UNION, REPRESENTED BY THE
EUROPEAN COMMISSION (100.0%)**

**Rue de la Loi, 200
1049 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**VALSESIA, ANDREA;
DESMET, CLOÉ;
COLPO, PASCAL y
ROSSI, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 737 726 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

Cribado de propiedades de nanopartículas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere generalmente a nanopartículas y en particular a un método y dispositivo para determinar rápidamente determinadas propiedades de las nanopartículas.

Antecedentes de la técnica

10 La caracterización extensiva de nanomateriales prístinos (NM), también denominados nanopartículas (NP), resulta de importancia para entender y controlar sus interacciones con sistemas biológicos. En efecto, crecientemente se está poniendo de manifiesto que los NM, aparte de sus ventajas en un gran número de sectores, presentan potencialmente efectos negativos sobre organismos vivos.

15 En efecto, la hidrofobicidad de la superficie de NM se ha informado, p.ej., que presenta un papel crítico en la incorporación celular, toxicidad y respuestas inmunológicas a los nanomateriales. Los NM con un grado elevado de hidrofobicidad superficial también se ha mostrado que producen hemólisis grave. Según algunas fuentes, los NM con hidrofobicidad superficial decreciente presentan una influencia sobre la adsorción de las proteínas plasmáticas. Además, durante el desarrollo de adyuvantes de vacunas basadas en nanopartículas, se afirma que la hidrofobicidad de los NM es un factor clave para modificar la interacción con las células inmunológicas.

Aunque estos son sólo algunos ejemplos, aparentemente las propiedades principales para las que resultaría deseable la determinación de datos fiables y reproducibles son:

- 20 (1) El tamaño y distribución de tamaños de los NM,
(2) Propiedades superficiales (carga superficial, hidrofobicidad) y
(3) Propiedades ópticas, mecánicas y magnéticas.

En particular, se ha demostrado que las propiedades de carga superficial e hidrofobicidad presentan efectos directos sobre la funcionalidad y toxicidad de los NM.

25 Existen múltiples técnicas de caracterización que permiten la caracterización de las propiedades de los NM, pero actualmente no existe ningún método único que permita la determinación de las propiedades superficiales y la distribución de tamaños en una sola etapa.

30 El tamaño y distribución de tamaños de los NM pueden determinarse mediante la utilización de una combinación de técnicas ópticas/de obtención de imágenes, mientras que las propiedades superficiales pueden determinarse con técnicas de análisis superficial (XPS [espectroscopía fotoelectrónica de rayos X], ToF-SIMS [por sus siglas en inglés, espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo]). Estos métodos son muy sensibles, aunque desafortunadamente resultan laboriosos y requieren equipos caros y conocimiento experto especializado.

35 El constante incremento de los NM presentes en los productos de consumo en un enorme número de campos y el elevado número de nuevas nanomedicinas basadas en los NM convierten en urgente la necesidad de desarrollar nuevas herramientas que permitan la caracterización rápida de las propiedades de los NM, tales como el tamaño de partícula, la química superficial y la hidrofobicidad. El documento nº WO2006/093055 describe un chip para analizar una sustancia. El chip consiste en un material dieléctrico que comprende surcos. Los surcos se hacen hidrófilos, mientras que la matriz es hidrófoba. Al repartir el material diana de análisis sobre la superficie, ocupará las zonas hidrófilas. A continuación, se analiza ópticamente el material de análisis.

Problema técnico

40 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un equipo y método de cribado apropiados para identificar y/o cuantificar rápida y fácilmente una pluralidad de propiedades de las nanopartículas, en particular el tamaño y preferentemente la distribución de tamaños, carga superficial y/o acidez y/o basicidad, hidrofobicidad y/o hidrofiliidad.

Descripción general de la invención

45 Con el fin de superar el problema anteriormente mencionado, la presente invención proporciona, en un primer aspecto, un chip de cribado de nanopartículas organizado para determinar propiedades físicas de las nanopartículas, en donde el chip de cribado comprende un sustrato que presenta una superficie de trabajo dividida en una pluralidad de zonas, en donde cada una de estas zonas presenta diferentes propiedades superficiales definidas por el componente de energía superficial (d,b,a), la energía libre total γ_{TOT} de la superficie de cada zona, estando definida de la manera siguiente:

$$\gamma_{TOT} = \gamma_{LW} + \gamma_{AB} = \gamma_{LW} + 2(\gamma_+ \gamma_-)^{0.5}$$

en donde los componentes son:

γ_{LW} = componente dispersivo = d

γ_{AB} = componente ácido-base, expresado por:

γ_+ = componente aceptor de electrones = b

5 γ_- = componente donador de electrones = a

y cada una de estas zonas comprende una pluralidad de subzonas, comprendiendo cada subzona una serie de orificios o surcos submicrométricos con un tamaño de apertura nominal diferente (S1, S2, S3, ...).

10 En el chip de cribado de nanopartículas de la invención, el número de zonas preferiblemente es de 5 a 100, más preferiblemente de 10 a 50, mientras que el número de subzonas preferiblemente es de 2 a 10, más preferiblemente de 3 a 6.

15 Evidentemente, el número de zonas y subzonas puede seleccionarse para ser más elevado que el indicado anteriormente si se desea de esta manera, p.ej. para afinar el análisis, especialmente para muestras complejas con un número enorme de diferentes nanopartículas. Sin embargo, a mayor número de zonas y/o subzonas, mayor número de ítems de información que deben capturarse y tratarse.

20 El sustrato del chip de cribado de nanopartículas es preferiblemente un sustrato altamente plano, preferiblemente seleccionado de vidrio o silicio. Para la microscopía de campo oscuro en modo reflexión (véase posteriormente), el sustrato se seleccionará adicionalmente para ser altamente reflectante, tal como mediante la deposición de un espejo dieléctrico unidimensional o un espejo plano de oro u otro metal noble sobre el sustrato. Tal como se muestra posteriormente, una configuración denominada de campo oscuro para la determinación resulta particularmente ventajosa; por lo tanto, resultan particularmente preferentes los sustratos altamente reflectantes.

25 En los chips de cribado de nanopartículas de la invención, las propiedades superficiales (tales como la carga superficial y la hidrofobicidad) de por lo menos una zona han sido modificadas para capturar nanopartículas que presentan propiedades correspondientes. Tal modificación de las propiedades superficiales puede realizarse mediante cualesquiera medios apropiados, tales como los tratamientos de plasma o haces iónicos, química húmeda, recubrimiento por inmersión, recubrimiento por centrifugación, autoensamblaje, ... Un medio particularmente preferente para modificar las propiedades superficiales locales es mediante deposición de plasma de una o más capas de por lo menos un polímero opcionalmente funcionalizado con propiedades superficiales controladas. Son ejemplos no limitativos, politetrafluoroetileno (PTFE), óxido de polietileno (PEO), poli(ácido acrílico) (PAA). Las propiedades superficiales del sustrato a continuación pueden adaptarse con precisión y modificarse correctamente, p.ej. mediante la utilización del autoensamblaje molecular de polielectrolitos, tal como, poli(cloruro de dialildimetilamonio) (PDDA) y poli(4-estireno sulfonato de sodio) (PSS) y otros polielectrolitos normalmente utilizados para la modificación de las propiedades superficiales. Resulta evidente en el contexto de la presente invención que los polímeros o polielectrolitos puedan combinarse según se desee o requiera para obtener propiedades superficiales adecuadas para discriminar las nanopartículas según sus propiedades físicas.

35 Tal como se muestra en mayor detalle posteriormente, los inventores han encontrado que las superficies hidrófobas podrían no atraer las nanopartículas hidrófobas contenidas en un medio acuoso como deberían, basándose en su naturaleza hidrófoba. Inesperadamente, mediante la cobertura de la capa hidrófoba con una capa superficial delgada (<< 100 nm) de compuesto hidrófilo, se incrementa significativamente la afinidad global para las NP hidrófobas. Por tanto, en un chip de cribado de nanopartículas según la invención, algunas de las zonas son zonas hidrófobas que comprenden una o más capas hidrófobas pueden comprender además una capa hidrófila superficial para incrementar su comportamiento hidrófobo.

En un segundo aspecto, la invención describe un método para cribar nanopartículas a fin de determinar propiedades físicas de las mismas, comprendiendo el método las etapas de:

- 45 (a) Alimentar nanopartículas en solución/suspensión sobre la superficie de trabajo de un chip de cribado de nanopartículas tal como se describe en la presente memoria,
- (b) Incubar las nanopartículas en solución sobre la superficie de trabajo durante un tiempo t y preferiblemente seguido del enjuague del chip de cribado de nanopartículas,
- 50 (c) Determinar las propiedades físicas de las nanopartículas mediante el análisis del chip de cribado de nanopartículas mediante microscopía, preferiblemente microscopía óptica.

Una primera ventaja de la invención es que la alimentación de las nanopartículas en la etapa (a) puede realizarse en suspensión o solución (coloidal), que, en el contexto de la presente invención, incluye los fluidos originales en los que pueden encontrarse contenidas las nanopartículas, posiblemente después de la dilución si se desea o resulta necesario. Por tanto, para la mayoría de aplicaciones, no existe ninguna necesidad de una preparación compleja o laboriosa de la muestra a analizar. Los fluidos apropiados pueden ser cualesquiera muestras obtenidas directamente del medio ambiente, muestras aéreas, tal como agua superficial o subterránea o lixiviados de suelo; del cuerpo animal o humano, tal como orina, sangre, suero, sudor, lágrimas, líquido sinovial o saliva; de plantas, tales como aceites,

zumos y otras bebidas; de alimentos o de productos artificiales, tales como pinturas, aditivos, lubricantes, medicamentos, ... Si se requiere o se desea, estas muestras pueden diluirse con un solvente apropiado. En una aplicación preferente, el dispositivo se utiliza para cribar regularmente productos basados en nanopartículas durante su procedimiento de fabricación industrial como sistema de control de calidad para comprar las propiedades superficiales y tamaño de medio de los NM, esto resulta especialmente interesante para productos de nanomedicina.

El objetivo de la incubación en la etapa (b) es proporcionar a las nanopartículas suficiente tiempo para extenderse sobre la superficie de trabajo y alcanzar aquellas zonas y subzonas correspondientes a sus propiedades físicas tal como se describe adicionalmente en la presente memoria. Por tanto, este tiempo 't' realmente necesario para buenos resultados puede variar dependiendo de un determinado número de propiedades, entre ellas el tamaño/densidad de las NP, su afinidad con el solvente/medio de suspensión, la viscosidad del solvente/medio de suspensión, la temperatura, ... En cualquier caso, el tiempo 't' requerido para una incubación apropiada puede ser fácilmente determinado por el experto en la materia conociendo que este tiempo es el tiempo para definir correctamente la afinidad de la NP para las diferentes superficies. En la mayoría de casos, el tiempo 't' será entre 2 segundos y 60 minutos, más generalmente, sin embargo, entre 5 segundos y 45 minutos. En otros casos, p.ej. especialmente en el caso de que el medio sea viscoso o las NP presenten bastante afinidad para el medio, puede seleccionarse el tiempo de incubación 't' para ser más largo, tal como de hasta 2 horas o incluso superior.

En el método presentado en la presente memoria, el pH y/o la concentración salina de la solución o suspensión que contiene nanopartículas preferiblemente se ajusta en la etapa (a) y/o en la etapa (b).

Tal como se explica en mayor detalle posteriormente, la determinación de las propiedades físicas de las nanopartículas puede comprender además el cálculo de las propiedades superficiales de las nanopartículas mediante determinación de los componentes ácido-base y de energía libre superficie de Lifshitz-Van der Waals (ΔG_{adh}^{AB} y ΔG_{adh}^{LW}):

$$\Delta G_{adh}^{AB} = -2 \left(\sqrt{\gamma_n^{AB}} - \sqrt{\gamma_l^{AB}} \right) \left(\sqrt{\gamma_s^{AB}} - \sqrt{\gamma_l^{AB}} \right)$$

$$\Delta G_{adh}^{LW} = -2 \left(\sqrt{\gamma_n^{LW}} - \sqrt{\gamma_l^{LW}} \right) \left(\sqrt{\gamma_s^{LW}} - \sqrt{\gamma_l^{LW}} \right)$$

en donde AB (LW, respectivamente) representa la interacción ácido base (de Lifshitz-Van der Waals, respectivamente) y $\gamma_n^{(AB)}$, $\gamma_l^{(AB)}$ y $\gamma_s^{(AB)}$ ($\gamma_n^{(LW)}$, $\gamma_l^{(LW)}$ y $\gamma_s^{(LW)}$, respectivamente) son los componentes ácido-base (de Lifshitz-Van der Waals, respectivamente) de las energías superficiales de la nanopartícula (n), medio solución/suspensión (l) y superficie sólida (s) de la zona.

La determinación de las propiedades físicas de las nanopartículas puede llevarse a cabo mediante cualquier método apropiado, tal como microscopía, mediante determinación de su localización sobre el chip de cribado. La localización dentro de una zona refleja las propiedades superficiales de la nanopartícula (hidrofobicidad y carga), mientras que su localización dentro de subzonas particulares permite deducir el tamaño y/o la distribución de tamaños. Preferiblemente, en la etapa (c), el chip de cribado de nanopartículas se inserta en un dispositivo de lectura dedicado que permite determinar ópticamente la presencia y la localización de nanopartículas dentro de las zonas y subzonas de la superficie de trabajo, en donde el dispositivo de lectura que comprende una fuente de luz, un dispositivo de sujeción dispuesto para sujetar dicho chip de cribado de nanopartículas respecto a dicha fuente de luz y un microscopio que permite medir la imagen de la superficie de trabajo, preferiblemente la imagen reflejada de la superficie de trabajo mediante un microscopio de campo oscuro, más preferiblemente incorporando adicionalmente una cámara, tal como una cámara CCD.

Aspectos y realizaciones todavía adicionales de la invención se refieren a un dispositivo de lectura de chip de cribado de nanopartículas, configurado para determinar ópticamente la presencia y propiedades físicas adicionales de las nanopartículas en un chip de cribado de nanopartículas tal como se describe en la presente memoria. Tal dispositivo de lectura generalmente comprende una fuente de luz, un dispositivo de sujeción dispuesto para sujetar dicho chip de cribado de nanopartículas delante de dicha fuente de luz, un detector de luz (reflejada) y/o un dispositivo de obtención de imágenes. En una realización particular, el dispositivo de lectura comprende un microscopio que permite medir la imagen reflejada de toda la superficie de trabajo, preferiblemente dicho microscopio se hace funcionar en configuración de campo oscuro, ventajosamente en combinación con una cámara CCD.

El dispositivo de lectura óptica preferiblemente se caracteriza por un determinado campo de visión (CdV) y apertura numérica (AN). La AN determinar el ángulo de incidencia del haz de luz de detección. Para una AN dada, las zonas planas (no estructuradas, sin rejilla de difracción) no reflejarán luz y aparecerán negras al detector. Por el contrario, las zonas con la rejilla de difracción se reflejarán a una longitud de onda dada, función del parámetro geométrico e índice de refracción de los orificios (en presencia o no de NM).

En resumen, puede afirmarse que la presente invención proporciona (entre otros) un método y dispositivo que permite la medición de las propiedades de las NP mediante estudios de cinética de adsorción, que se llevan a cabo muy elegante y rápidamente.

En efecto, al contrario que el caso de superficies planas, actualmente no se lleva a cabo bien la determinación de las propiedades superficiales de las NP: se lleva a cabo, p.ej., mediante la medición de la adsorción de un pigmento (rosa de Bengala) a diferentes concentraciones y midiendo la concentración de equilibrio de adsorción del pigmento adsorbido. Mediante la medición de la pendiente $(c-c_0)/c_0$ para diferentes concentraciones c_0 ('c' es la concentración de pigmento no adsorbido, c_0 es la concentración total de pigmento) para un número dado de nanopartículas, la pendiente proporciona un valor relativo de hidrofobicidad. Sin embargo, no funciona para todos los intervalos de hidrofobicidad y no proporciona un valor de hidrofobicidad en unidades del SI.

Otro método de medición puede llevarse a cabo mediante la medición de la adsorción de NP en columnas con un relleno de diferentes hidrofobicidades. Nuevamente, no se obtienen ningún valor absoluto de los componentes de energía superficial de la superficie de la NP.

Con la presente invención, por el contrario, se calcula preferiblemente el componente de energía superficial de la nanopartícula γ_{LW} y γ_{AB} mediante ajuste multiparamétrico del cálculo de entalpía libre total basado en la teoría DLVO ampliada, conociendo que la tasa de adsorción de las NP en, p.ej., 16 superficies diferentes, es proporcional a la entalpía libre. Por tanto, se miden las tasas de adsorción sobre estas 16 superficies diferentes con componentes de energía superficial conocidos, se calcula la entalpía libre de adsorción con 4 incógnitas respecto a la superficie de las NP: γ_{LW} , γ_+ y γ_- (que representan los dos componentes de γ_{AB}) y la pendiente 's' de la tasa de adsorción vs. la entalpía libre. Debe subrayarse que la interacción electrostática, en caso de hallarse presente, se conoce a partir de la medición de los potenciales zeta de la superficie y de las nanopartículas.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describen realizaciones preferentes de la invención, a título de ejemplo, en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La fig. 1 es una vista en perspectiva esquemática de una realización de un chip de cribado de nanopartículas,

La fig. 2 es una sección esquemática a través de una realización adicional de un chip de cribado de nanopartículas durante la alimentación con un fluido que contiene nanopartículas,

La fig. 3 es una representación esquemática de una realización adicional de un chip de cribado de nanopartículas que muestra una pluralidad de zonas (señaladas como A01, ... en la fig. 3(A)) con diferentes propiedades dispersivas, ácido-base y de carga, y dentro de cada una de dichas zonas se localizan subzonas con diferentes tamaños de orificio (mostrados como tres rectángulos dentro de las zonas A01, A02 y A03, aunque no representadas, cada una de las demás zonas preferiblemente presenta las mismas o equivalentes subzonas),

La fig. 4 es una representación esquemática de condiciones desfavorables que impiden que las nanopartículas hidrófobas se unan a una superficie hidrófoba, así como de una manera de conseguir que estas condiciones resulten más favorables.

La fig. 5 es un diagrama que muestra la cinética de unión de las nanopartículas a una superficie, en el que la pendiente 's' (línea recta) de la curva es proporcional al equilibrio de energía libre superficial ΔG_{adh} .

La fig. 6 son dos fotografías de SEM (por sus siglas en inglés, microscopio electrónico de barrido) de nanopartículas de 200 nm, una vez sobre un sustrato que presenta surcos de 300 nm de apertura (A) y una vez sobre un sustrato que presenta surcos de 100 nm de apertura (B).

La fig. 7 es una configuración esquemática de un dispositivo de lectura utilizable para implementar un método tal como se describe en la presente memoria, en particular con un chip de cribado de nanopartículas de la invención.

Resultarán evidentes datos y ventajas adicionales de la presente invención a partir de la descripción detallada siguiente de varias realizaciones no limitativas en referencia a los dibujos adjuntos.

Descripción de realizaciones preferentes

Tal como se ilustra en las figs. 1 a 3, el método preferiblemente utiliza un chip de cribado 1 (también denominado chip detector) que comprende un sustrato ópticamente reflectante 10 con una superficie (de trabajo) 11 provista de zonas 12 que presentan diferentes propiedades superficiales.

Tal como se representa esquemáticamente en las figs. 1 y 3, cada zona 12 se caracteriza por valores dados de los componentes de energía libre superficial, definiendo la energía libre total de una superficie sólida como:

$$\gamma_{TOT} = \gamma_{LW} + \gamma_{AB} = \gamma_{LW} + 2(\gamma_+ \gamma_-)^{0.5}$$

en la que los componentes son:

$$\gamma_{LW} = \text{componente dispersivo (Lifshitz-van der Waals)} = d$$

y_+ = componente aceptor de electrones = b

y_- = componente donador de electrones = a

5 Cada zona individual 12 de la superficie puede definirse, de esta manera, mediante los tres componentes (también denominado triplete) (d,b,a). La superficie 11 del chip detector 1 puede caracterizarse, de esta manera, mediante una pluralidad de zonas 12 y cada una de ellas presenta diferentes propiedades superficiales, es decir, componentes de energía superficial (d,b,a).

Por tanto, los NM 20 en suspensión o en una solución coloidal se caracterizan por tripletes equivalentes de valores de energía superficial según sus propiedades superficiales.

Por tanto, un triplete (d,b,a) puede definirse para cualquier NM dado, NM(d,b,a).

10 Tal como se muestra en la fig. 2, los NM 20 que fluyen (tal como se indica mediante la flecha horizontal 30) a lo largo de la superficie detectora del chip 11 mediante, p.ej., una celda de líquido, resultarán atraídos (ilustrado por las flechas que señalan la superficie 11) por las zonas respectivas $A = A(d,b,a)$ según sus propiedades superficiales NM(d,b,a). Los NM que presenten diferentes propiedades superficiales no resultarán atraídos o incluso resultarán repelidos (flechas que señalan en dirección contraria a la superficie 11) y, de esta manera, permanecerán dentro del líquido hasta que alcancen una zona que se corresponda con sus propiedades superficiales NM(d,b,a).

Mediante este método, el triplete (d,b,a) de los NM se reconstruirá según la afinidad de los NM para las diferentes zonas con las propiedades superficiales correspondientes.

Además, cada zona 12 sobre el chip detector está compuesta de diferentes zonas más pequeñas (subzonas 13) tal como se muestra en la fig. 3 (B) caracterizadas por una serie de orificios o surcos submicrométricos 15. Cada subzona 13 se caracteriza por orificios o surcos 15 con diferentes tamaños de apertura, S, tales como S1, S2, S3, ..., Sn.

25 Cada subzona 13 se caracteriza por una respuesta óptica particular, al iluminarla con un haz de luz visible en un determinado ángulo de incidencia y polarización. Como consecuencia de la nanorejilla, la luz incidente resulta difractada a una longitud de onda dada como función del índice refractivo del orificio o surco 15 que contiene o no los NM. La presencia de NM 20 en los orificios o surcos 15 puede, de esta manera, monitorizarse mediante la medición de la longitud de onda de la luz difractada.

30 Por tanto, los NM 20 durante su transporte a lo largo de la superficie 11 del chip 1 resultan atraídos (o no) por fuerzas hidrófobas o de otro tipo hacia la superficie. Entre los NM atraídos, solo aquellos con un diámetro inferior al tamaño de apertura de los orificios S serán capturados dentro de los orificios o surcos 15. Los NM capturados dentro de los orificios modificarán localmente el índice refractivo de los nano-orificios y modificará la respuesta óptica de la rejilla. Mediante la monitorización de la respuesta óptica, puede detectarse la presencia de NM con un diámetro inferior a un determinado tamaño S_{min} (tamaño de orificio).

El lector óptico preferiblemente consiste en un microscopio en configuración de campo oscuro (CO), en particular con una cámara CD que permita la captura y la medición de la imagen reflejada de la totalidad de la superficie de detección.

35 El lector óptico se caracteriza por un determinado Campo de visión (CdV) y una Apertura numérica (AN). La AN determina el ángulo de incidencia del haz de luz de detección. Para una AN dada, las zonas planas (no estructuras, sin rejilla de difracción) no reflejarán luz y aparecerán negras al detector. Por el contrario, las zonas con la rejilla de difracción se reflejarán a una longitud de onda dada, función del parámetro geométrico de la rejilla y el índice refractivo de los orificios (en presencia o no de NM).

40 Al llenar los NM los orificios de la rejilla, el color reflejado de la zona cambiará correspondientemente, de manera que la presencia de NM en los orificios puede monitorizarse a partir de los cambios de color visualmente o con un sensor de cámara.

En otro aspecto, la invención en particular se refiere al chip detector (chip de cribado de nanopartículas) que presenta las características descritas en la presente memoria.

45 Según los inventores, la ventaja principal de la invención es que la solución propuesta permite el rápido cribado de muestras que contienen NM. En efecto, el detector permitirá la detección en unos pocos segundos (y con una cantidad muy limitada de muestra, tal como unos pocos cientos de μ l) la presencia de NM más pequeños que el tamaño S_{min} . Además, la utilización de diferentes S_{min} dentro de una subzona y por tanto la presencia y proporción de NM dentro de uno o más de los orificios de diferente tamaño, proporcionará información sobre la distribución de tamaños de los NM. Junto con el tamaño mínimo, el dispositivo permitirá caracterizar la propiedad superficial de los NM, determinar sus componentes ácido, básico o dispersivo, así como sus tamaños y distribuciones de tamaños.

Posteriormente se describen algunos experimentos y consideraciones realizadas en el contexto de llevar a cabo la presente invención. Estos experimentos proporcionan una guía adicional para el experto para la reducción a la práctica

de la presente invención. La información posteriormente no debería, sin embargo, interpretarse como limitativa de la invención a las realizaciones y resultados particulares descritos.

Experimentos y diseño experimental

A) Modificación de los componentes de energía superficial

- 5 Se modificó un sustrato de silicio (podría ser de vidrio o cualquier otra superficie plana) mediante diferentes deposiciones de plasma con el fin de ajustar la hidrofobicidad superficial. Se utilizó politetrafluoroetileno para generar una superficie hidrófoba, la deposición se realizó utilizando octofluorociclobutano (C_8F_8) puro como el gas precursor a una presión de 3,2 Pa (27 mTorr), aplicando una potencia de 142 W durante 5 min. Se depositó ácido acrílico polimerizado con plasma a modo de una superficie hidrófila, utilizando ácido acrílico como el gas precursor a una presión de 2,1 Pa (16 mTorr), aplicando una potencia de polarización de 400 W durante 5 min.

Capa de polielectrolito mediante deposición de capa

- 15 Con el fin de ajustar la hidrofobicidad superficial, se llevó a cabo una deposición capa-a-capa de dos polielectrolitos. Los sustratos modificados con plasma se incubaron durante 2 min en solución al 2% de poli(cloruro de dialildimetilamonio) (PDDA) en agua o en poli(4-estireno sulfonato sódico) (PSS) al 2% en agua para la deposición por autoensamblaje de cada polielectrolito capa-a-capa, partiendo de PDDA (cargado positivamente) y alternando con PSS (cargado negativamente). Después de cada etapa, se enjuagaba el sustrato con agua milliQ y se secaba bajo flujo de nitrógeno.

- 20 Se llevó a cabo un primer estudio utilizando partículas de poliestireno de 200 nm de diámetro (microesferas Polybead®, Polysciences). Se seleccionaron dichas partículas comerciales como modelo debido al gran abanico de tamaños y funcionalización superficial (correspondiente a diferentes hidrofobicidades y cargas) ofrecidos por el proveedor. Las partículas no modificadas se estabilizaron con grupos sulfonato; estaban cargadas negativamente y eran hidrófobas.

- 25 Las superficies modificadas se incubaron con las partículas modelo con el fin de evaluar la unión, asociadas a las fuerzas de interacción entre las partículas y las superficies. El experimento se llevó a cabo utilizando 16 condiciones diferentes de concentración salina ($[NaCl] = 0 / 1 / 10 / 100$ mM) y pH (2 / 4 / 7 / 10) en solución acuosa en la que se dispersaron las partículas a la concentración original. La incubación tuvo lugar con el sustrato totalmente sumergido en las diferentes soluciones durante 30 min, después se enjuagaron por completo con agua milliQ y se secaron bajo flujo de nitrógeno. Finalmente se obtuvieron imágenes de las superficies mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).

- 30 Se llevó a cabo el mismo experimento con partículas de poliestireno modificadas con grupos hidroxilo. La modificación superficial proporcionó a las partículas una hidrofiliidad más elevada.

- 35 Con el fin de estudiar la unión selectiva de las NP sobre superficies modificadas químicamente, se prepararon dos juegos de muestras. Un primer juego de muestras de silicio se había recubierto en primer lugar con una capa depositada con plasma de PTFE, seguido de varias capas de polielectrolito (PPS/PDDA) para reducir el nivel de hidrofobicidad. Se preparó un segundo juego de muestras con una capa inicial de PAA. Estas muestras habían sido modificadas también mediante deposición de PE para reducir la hidrofobicidad superficial.

Los resultados de caracterización se presentan en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1: resumen de la caracterización de la superficie modificada con PTFE

	Ángulo de contacto (°)	Altura elipsométrica (nm)	Rugosidad según AFM* (nm)	Potencial Z a pH 7
PSS nº 3	19,8 ± 0,4	0,65 ± 0,01	0,76 ± 0,08	-57,64 ± 0,31
PDDA nº 3	37,4 ± 0,3	0,44 ± 0,01	0,85 ± 0,09	-4,13 ± 0,33
PSS nº 2	53,3 ± 0,8	0,69 ± 0,01	0,83 ± 0,08	-62,37 ± 0,59
PDDA nº 2	65,4 ± 0,6	1,11 ± 0,02	0,85 ± 0,09	-4,93 ± 0,25
PSS nº 1	64,6 ± 0,7	0,66 ± 0,01	0,48 ± 0,05	-60,22 ± 0,90
PDDA nº 1	79,3 ± 0,7	1,43 ± 0,02	0,45 ± 0,05	-26,28 ± 0,24
PTFE	106,8 ± 0,4		0,29 ± 0,03	-61,18 ± 0,13

*por sus siglas en inglés, microscopía de fuerza atómica

40

Tabla 2: resumen de la caracterización de la superficie modificada con PAA

	Ángulo de contacto (°)	Altura elipsométrica (nm)	Rugosidad según AFM (nm)	Potencial Z a pH 7
PSS nº 3	22,8 ± 0,4	0,65 ± 0,01	1,87 ± 0,19	-62,60 ± 0,33
PDDA nº 3	28,2 ± 0,6	0,44 ± 0,01	1,88 ± 0,19	-6,53 ± 0,68
PSS nº 2	25,2 ± 0,1	0,69 ± 0,01	1,09 ± 0,11	-50,37 ± 0,92

PDDA nº 2	30,9 ± 0,4	1,11 ± 0,02	0,77 ± 0,08	2,80 ± 0,15
PSS nº 1	41,4 ± 0,8	0,66 ± 0,01	0,65 ± 0,07	-47,36 ± 0,29
PDDA nº 1	52,1 ± 0,5	1,43 ± 0,02	0,12 ± 0,01	-5,04 ± 0,53
PAA	58,3 ± 0,5		0,23 ± 0,02	-78,12 ± 1,38

Tal como se muestra en la Tabla 1, la muestra recubierta con capa depositada con plasma de PTFE era altamente hidrófoba, con un ángulo de contacto de 106°. Para cada capa de polielectrolito, la medición de ángulo de contacto mostró una reducción de la hidrofobicidad de la superficie, de 80° (hidrófobo) para la primera capa, a 20°C (altamente hidrófilo) para la 6ª capa. La elipsometría (técnica óptica para investigar las propiedades dieléctricas de películas delgadas) permitió medir el grosor de cada capa de polielectrolito. Las capas de PSS eran de aproximadamente 0,7 nm de grosor, y cada capa de PDDA era entre 1,4 y 0,4 nm, siendo la primera la más gruesa. La microscopía de fuerza electrónica (AFM, por sus siglas en inglés) proporcionó información sobre el grosor, que se incrementó con las primeras 3 capas de 0,3 a 0,8 antes de estabilizarse en aproximadamente 0,8 nm para las últimas 3 capas. Se midió el potencial Z para diferente pH; para todas las capas se obtuvo un potencial z negativo para todo el rango de pH, especialmente para las capas no modificadas con PTFE y las capas de PSS, y más próximo a neutro para las diferentes capas de PDDA. Este resultado puede explicarse en que el PDDA está cargado positivamente y el PDDA y el PTFE están cargados negativamente.

Los experimentos realizados sobre la superficie modificada con PAA (Tabla 2) mostraron la misma tendencia. Con una capa base de PAA más hidrófila, en efecto podrían alcanzarse las mismas propiedades superficiales con un incremento de hidrofiliidad con las capas de polielectrolitos, un incremento más importante de rugosidad y un potencial zeta negativo para todas las condiciones. La 6ª capa permitió obtener propiedades superficiales similares con dos sustratos de propiedades diferentes: PTFE o PAA.

También se llevó a cabo el análisis mediante XPS y ToF-SIMS de las modificaciones superficiales mediante deposición de plasma de PTFE y deposición de polielectrolitos capa-a-capas (datos no mostrados). El análisis de superficie mediante experimentos de XPS demostró la presencia del PTFE sobre el sustrato de silicio, y el experimento de ToF-SIMS confirmó dichas observaciones, con un análisis que es más sensible a la superficie: la cobertura del sustrato de silicio con el plasma de PTFE y de la capa base de PTFE con las 6 capas de polielectrolitos.

Estudio de unión de nanopartículas

Nanopartículas hidrófobas

Partiendo de que los sustratos de silicio modificados mediante deposición de plasma de PTFE mostraban una elevada hidrofobicidad, se llevó a cabo un primer experimento con partículas hidrófobas en diferentes condiciones. Las partículas PS bajo 16 condiciones de pH y fuerza iónica se incubaron sobre la superficie con el fin de evaluar la unión de partículas hidrófobas con una superficie hidrófoba, que se esperaba elevada debido a las fuerzas hidrófobas. A continuación, se analizaron las superficies mediante SEM y se calculó la proporción de cobertura superficial para las diferentes condiciones utilizando el software ImageJ. Se presentan estos resultados en la Tabla 3.

Tabla 3: cobertura de superficie (%) de partículas PS sobre PTFE, ángulo de contacto = 105°

		pH			
		2	4	7	10
Potencial Z		3	-32	-54	-140
[NaCl] mM	0	2,5	2,4	0,8	0,6
	1	2,1	0,2	0,1	0,9
	10	5,6	6,6	0,1	0,0
	100	2,5	27,0	2,8	0,3

Inesperadamente, la tasa de unión era baja en todas las condiciones, con una ligera tendencia a una unión más elevada a pH bajo y concentración salina elevada.

La unión reducida de las NP a la superficie de PTFE hidrófoba se atribuyó hipotéticamente a la baja humectabilidad de la superficie de PTFE con la creación de microburbujas, las cuales impiden el contacto entre la superficie y las partículas en la suspensión en agua, evitando que se produzcan fuerzas hidrófobas.

Las cargas negativas en la superficie de la capa de PTFE y de las partículas en efecto se encontrarían reducidas a pH bajo y fuerza iónica elevada; bajo estas condiciones, la repulsión de largo alcance por fuerzas electrostáticas se vería drásticamente reducida, permitiendo que tuvieran lugar las fuerzas hidrófobas de más corto alcance.

Se propuso la hipótesis siguiente para entender el bajo nivel de unión en todas las condiciones. La interfaz entre la superficie y las partículas debería considerarse como múltiples interfaces: debido a que las partículas se incuban en una solución acuosa, el agua desempeña un papel importante en la interacción sustrato-partículas con una interfaz sustrato-agua y otra interfaz partículas-agua. La exposición del sustrato altamente hidrófobo al agua generaría

microburbujas de aire que limitarían el contacto, y ocurriría lo mismo sobre la superficie de las partículas hidrófobas. Estas microburbujas podrían crear una barrera física, impidiendo que las partículas se aproximasen lo suficiente a la superficie para que tuviesen lugar las interacciones hidrófobas. A fin de limitar la presencia de dichas burbujas de aire, permitiendo el contacto del agua con la superficie, en este caso debería reducirse la hidrofobicidad.

- 5 Con el fin de verificar dicha hipótesis, se llevaron a cabo los mismos experimentos con la superficie de PTFE modificada con capas de polielectrolitos. Debido a que el número de capas de polielectrolito presenta una influencia directa sobre la hidrofobicidad, tal como se observa con las mediciones del ángulo de contacto), resultó posible conseguir cuatro grados diferentes de hidrofobicidad, correspondientes a los ángulos de contacto de 105°, 70°, 50° y 20°. La observación de las superficies después de la incubación de las partículas mostró un incremento progresivo de la unión, con una cobertura superficial creciente de la superficie a menor ángulo de contacto. La cobertura superficial por las partículas calculada para el ángulo de contacto más bajo se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4: cobertura superficial de partículas PS sobre PTFE+PE (6 capas), ángulo de contacto = 20°

		pH			
		2	4	7	10
Potencial Z		-3	-49	-60	-100
[NaCl] mM	0	54,2	57,2	33,0	3,6
	1	40,4	37,8	30,5	30,9
	10	49,2	43,4	48,0	47,6
	100	83,3	64,3	55,1	51,5

- 15 En comparación con los resultados sin polielectrolitos, la cobertura superficial por las partículas se incrementó drásticamente con las 6 capas de polielectrolitos. Además, se confirmó la tendencia ya observada, con un importante incremento de la unión a menor pH y mayor fuerza iónica. A fin de comparar la tasa de unión obtenida sobre un sustrato hidrófobo + capa superficial hidrófila con la tasa de unión sobre un sustrato hidrófilo y a fin de verificar la teoría de las interacciones de largo alcance, se llevó a cabo otro experimento utilizando el PAA depositado con plasma previamente descrito, con y sin la modificación de polielectrolitos. Se ajustó el grado de hidrofobicidad entre 20° de ángulo de contacto sin polielectrolito y 60° con seis capas de polielectrolitos. Las diferentes superficies después de la incubación de las partículas de poliestireno hidrófobas bajo las mismas condiciones que anteriormente se observaron mediante SEM y los resultados en términos de cobertura superficial se presentan en la Tabla 5 para PAA solo (a) y PAA con seis capas de polielectrolitos (b).

25 Tabla 5: cobertura superficial de partículas PS sobre a. PAA, b. PAA + PE

		pH			
		2	4	7	10
a.		PAA			
Potencial Z		-26	-45	-78	-83
[NaCl] mM	0	0,0	3,4	0,0	0,0
	1	0,9	0,1	0,0	0,0
	10	0,1	0,2	1,8	0,0
	100	80,8	51,6	39,4	0,4
b.		PAA + PE			
Potencial Z		-20	-50	-63	-53
[NaCl] mM	0	1,0	0,0	0,0	0,0
	1	43,1	0,0	0,0	0,0
	10	32,0	0,6	0,0	0,1
	100	59,3	54,2	19,9	27,5

- 30 Tal como puede observarse tanto para PAA solo como PAA + PE, la cobertura superficial es extremadamente baja para la mayoría de las condiciones, con una concentración salina entre 0 y 10, y para todos los pH en PAA solo y para pH 4 a 10 en PAA + PE. La tendencia ya observada anteriormente todavía se encuentra presente, con un incremento de la tasa de unión a mayor fuerza iónica y menor pH, aunque más marcadamente que antes, ya que la unión de las partículas se incrementa únicamente bajo dichas condiciones extremas. En la comparación con los resultados de los sustratos de PAA y PTFE sin polielectrolitos (Tablas 3 y 5a), puede asumirse que, con la fuerza iónica más alta, la unión es más importante a PAA que a PTFE, debido a la barrera física existente por las propiedades altamente hidrófobas del PTFE. Sin embargo, la diferencia principal aparentemente se encuentra entre PTFE + PE y PAA + PE (Tablas 4 y 5b). En efecto, la adición de las capas de polielectrolitos induce un gran incremento de la unión al sustrato hidrófobo, mientras que el cambio con polielectrolito en PAA resulta significativo sólo a pH 2 con sal, demostrando que la capa superficial hidrófila sola permite que tengan lugar las interacciones hidrófobas, resultando en la unión de las partículas hidrófobas únicamente al sustrato hidrófobo.

En la fig. 4 se presenta un modelo esquemático de interacción de las fuerzas hidrófobas de largo alcance y el efecto de la hidrofobicidad del sustrato.

Tal como se presenta en la fig. 4, que muestra el modelo teórico de interacciones según diferentes condiciones, en el primer caso analizado, el PTFE hidrófobo se encontraba en contacto directo con el medio acuoso que contenía las partículas. Bajo esta condición, se genera una interfaz de aire que limita los contactos entre el agua y el sustrato hidrófilo, y esto impide la interacción física entre las partículas y el sustrato. Además, si no se evita la repulsión electrostática mediante una reducción del pH y/o un incremento de la fuerza iónica, las interacciones hidrófobas que actúan a distancias más cortas no pueden tener lugar. Por el contrario, mediante la minimización de la repulsión electrostática gracias a un pH bajo y una concentración salina elevada, y permitiendo la interacción física mediante la utilización de una capa hidrófila superficial sobre el sustrato hidrófobo, pueden obtenerse las condiciones más favorables para la unión de las partículas hidrófobas sobre el sustrato hidrófobo. La capa hidrófila debe ser suficientemente delgada ($\ll 100$ nm) a fin de que tengan lugar las interacciones hidrófobas de largo alcance. La utilización de una capa de polielectrolito en este caso es un buen modo de obtener una hidrofiliidad elevada con una cobertura delgada del sustrato hidrófobo. El grado de hidrofobicidad/hidrofiliidad superficial, también denominado humectabilidad, por lo tanto, no controla la unión pero permite que tengan lugar las interacciones hidrófobas.

Partículas hidrófilas

La segunda parte del estudio consistió en la evaluación de la unión de las partículas hidrófilas sobre los sustratos utilizados anteriormente. Considerando que el mecanismo del sistema se basa en interacciones hidrófobas, su interés sería permitir la caracterización de la hidrofobicidad de las partículas gracias a la diferente respuesta de unión a las zonas con patrón. Las partículas utilizadas para esta parte del estudio eran las mismas partículas de poliestireno, aunque modificadas con grupos hidroxilo que les proporcionan propiedades hidrófilas.

Las partículas de PS-OH bajo las 16 condiciones de pH y fuerza iónica se incubaron sobre las diferentes superficies. El análisis mediante SEM permitió entonces calcular la proporción de cobertura superficial para las diferentes condiciones. Los resultados obtenidos con PTFE, PTFE + PE, PAA y PAA + PE se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: cobertura superficial de partículas de PS-OH sobre a. PTFE, b. PTFE+PE, c. PAA, d. PAA+PE

		pH			
		2	4	7	10
a.		PTFE			
[NaCl] mM	0	0,0	0,2	0,0	0,0
	1	0,0	0,0	0,0	0,0
	10	6,9	0,0	0,0	0,0
	100	0,0	0,6	4,0	0,0
b.		PTFE + PE			
[NaCl] mM	0	0,3	0,2	0,0	0,0
	1	0,9	0,4	0,0	0,2
	10	0,6	0,7	0,1	0,1
	100	2,6	10,2	1,9	6,5
c.		PAA			
[NaCl] mM	0	0,2	0,0	0,0	0,0
	1	0,8	0,5	0,0	0,0
	10	0,2	0,1	0,1	0,0
	100	36,5	51,7	22,2	1,6
d.		PAA + PE			
[NaCl] mM	0	0,3	0,0	0,0	0,0
	1	0,3	0,0	0,0	0,0
	10	2,3	0,1	0,0	0,0
	100	54,0	37,8	1,0	1,4

Tal como puede observarse, las partículas hidrófilas presentan una tasa de unión extremadamente baja ($<1\%$ en la mayoría de casos) para todas las condiciones sobre el sustrato hidrófobo, modificado o no. Sobre el sustrato hidrófilo, modificado con los polielectrolitos o no, no se produce unión bajo la mayoría de las condiciones, con una unión significativa únicamente para una concentración salina elevada y pH negativo, tal como ya se ha observado anteriormente. Estos resultados confirman lo esperado: sin interacciones hidrófobas las partículas hidrófilas no se unieron a las diferentes superficies.

B) Método para la determinación de la energía libre superficial de las nanopartículas (desconocidas)

El método genérico para la determinación de la energía superficial de una muestra desconocida de nanopartículas es similar al modelo DLVO ampliado (Van Oss et al., J. Colloid Interface Sci. 111, 378-390).

En el caso de que una nanopartícula en suspensión (muchas nanopartículas) establezca un contacto estrecho con una superficie, existen diferentes fuerzas que atraerán o repelerán la NP hacia/desde la superficie.

Las fuerzas se ajustan a la expresión:

$$F_{adh} = F^{LW} + F^{EL} + F^{AB}$$

5 donde F^{LW} : fuerza de interacción de Lifshitz-Van der Waals (atractiva, corto alcance)

F^{EL} : fuerza de interacción electrostática (atractiva o repulsiva, largo alcance)

F^{AB} : fuerza de interacción ácido-base (interacción hidrófoba)

El componente de Lifshitz-Van der Waals siempre es atractivo y siempre se encuentra presente.

10 El componente electrostático puede ser atractivo o repulsivo, pero en cualquier caso puede eliminarse totalmente incrementando la concentración salina. En cualquier caso, sus valores son conocidos a partir de la medición de los potenciales zeta de las nanopartículas y las superficies activas del chip. Entre dos superficies con la misma carga es repulsivo.

Las fuerzas AB incluyen la interacción hidrófoba.

15 Si se asume que las fuerzas de atracción son EXCLUSIVAMENTE fuerzas AB, son de largo alcance (actúan cuando la NP se encuentra a varios nm de la superficie) y son fuertes (esto se controla a partir de las condiciones experimentales presentes).

Las NP resultan atraídas a la superficie y permanecen ahí únicamente en el caso de que se encuentren en una situación que minimice la energía libre superficial del sistema superficie-líquido-NP. Por definición:

l: líquido n: nanopartícula s: sustrato

20 Energías libres interfaciales:

γ_{sl} CONOCIDO

γ_{sn} MEDIDO

γ_{nl} DEBE DETERMINARSE

Energía libre de adhesión $\Delta G_{adh} = \gamma_{nl} - \gamma_{sn} - \gamma_{sl}$

25 El equilibrio de energía libre superficial (ΔG_{adh}) es el equilibrio entre las energías interfaciales (de la NP y la superficie) con el líquido y la interfaz de NP y superficie.

El presente objetivo es calcular la γ_{nl} (componente de energía superficial de la NP, en particular el componente LW-hidrófobo).

La relación geométrica entre los componentes superficiales puede expresarse del modo siguiente:

30
$$\Delta G_{adh}^{AB} = -2 \left(\sqrt{\gamma_n^{AB}} - \sqrt{\gamma_l^{AB}} \right) \left(\sqrt{\gamma_s^{AB}} - \sqrt{\gamma_l^{AB}} \right)$$

$$\Delta G_{adh}^{LW} = -2 \left(\sqrt{\gamma_n^{LW}} - \sqrt{\gamma_l^{LW}} \right) \left(\sqrt{\gamma_s^{LW}} - \sqrt{\gamma_l^{LW}} \right)$$

35 en donde AB (LW, respectivamente) representa la interacción ácido-base (de Lifshitz-Van der Waals, respectivamente) y $\gamma_{n(AB)}$, $\gamma_{l(AB)}$ y $\gamma_{s(AB)}$ ($\gamma_{n(LW)}$, $\gamma_{l(LW)}$ y $\gamma_{s(LW)}$, respectivamente) son los componentes ácido base (Lifshitz-Van der Waals, respectivamente) de las energías superficiales de la nanopartícula (n), medio solución/suspensión (l) y superficie sólida (s) de la zona. $\gamma_{l(AB)}$ se conoce de la literatura y $\gamma_{s(AB)}$ es conocida para cada superficie modificada (y se mide y es conocida para cada zona del dispositivo). $\gamma_{n(AB)}$ es el parámetro desconocido de la NP que debe determinarse mediante el presente método.

40 Con el sistema presentado, la ΔG_{adh} puede medirse directamente mediante la medición de la cinética de adsorción de las nanopartículas sobre la superficie. En particular, ΔG_{adh} es proporcional a la pendiente 's' de la cinética de adsorción (véase la fig. 5).

Por tanto, una etapa de determinación preferente de un método de la invención podría resumirse de la manera siguiente:

- (a) se miden y se conocen las propiedades superficiales de cada superficie,
- (b) se mide la cinética de adsorción de la NP sobre cada superficie
- (c) se calculan las propiedades superficiales de la NP.

C) Microfabricación de las zonas con diferentes propiedades superficiales controladas

5 Las zonas caracterizadas por propiedades superficiales controladas (tal como se ha explicado anteriormente) pueden micrograbarse sobre una misma superficie, p.ej., mediante el dispositivo de microfluidos (MFD, por sus siglas en inglés) siguiente diseñado por los inventores.

1) La superficie del chip puede modificarse con PTFE o PAA o cualquier otro polímero con hidrofobicidad/hidrofilicidad controlada,

10 2) El MFD se aplica sobre la parte superior del chip,

3) En cada zona del MFD se hace fluir un determinado número de capas de polielectrolitos con el fin de modificar localmente las propiedades superficiales.

D) Nanofabricación del filtro físico o elementos de captura

15 Los filtros físicos o estructuras de captura para las nanopartículas (series de orificios o serie de surcos) se nanofabrican sobre la superficie del chip, p.ej., mediante molienda con haces iónicos, aunque la misma estructura puede producirse utilizando diferentes técnicas de fabricación.

El propósito básico es:

1) Crear una rejilla de difracción (constituida de orificios o surcos)

2) La misma rejilla de difracción filtra las NP

20 3) Sólo las NP más pequeñas que el tamaño de la rejilla pueden caer por el interior de la misma

4) La respuesta óptica de la rejilla de difracción cambia únicamente en el caso de que las NP se encuentren localizadas dentro de los surcos

5) De esta manera, las partículas que son más pequeñas que un tamaño seleccionado pueden detectarse fácilmente.

25 Por ejemplo:

La rejilla 1, que presenta líneas (surcos) de 300 nm de anchura, es alimentada con nanopartículas de 200 nm.

La rejilla 2, que presenta líneas de 100 nm de anchura, es alimentada con NP de 200 nm.

30 Resulta evidente que las NP de 200 nm caerán dentro de los surcos de 300 nm, mientras que se mantendrán sobre los surcos de 100 nm (ver la fig. 6 (A) y (B), que son imágenes de SEM de NP de poliestireno sobre una superficie hidrófoba).

1) La respuesta óptica del espectro de difracción de la rejilla 1 resulta modificada por la presencia de las NP en los surcos (fig. 6(A)).

2) La respuesta óptica del espectro de difracción de la rejilla 2 resulta modificada por la presencia de las NP sobre los surcos (fig. 6(B)).

35 Los cambios de respuesta óptica pueden monitorizarse en tiempo real durante la adsorción de las NP y puede reconstruirse la curva cinética para calcular ΔG_{adh} (véase anteriormente y la fig. 5). Además, resulta posible realizar un cribado rápido del tamaño de las NP.

E) Configuración óptica ilustrativa para la detección en tiempo real de las NP sobre la superficie del chip.

40 Un sistema preferente para analizar las NP sobre el chip de cribado básicamente comprende un microscopio de campo oscuro con un gran Campo de visión (para detectar todas las zonas del chip simultáneamente), que permite la detección de las NP dentro o fuera de las rejillas de difracción y en donde la detección puede llevarse a cabo en tiempo real.

Se muestra un ejemplo en la fig. 7, en donde una fuente de luz 41 emite luz que pasa por un primer sistema de lentes 42, se refleja en un divisor de haz 43 a través de la pupila de iluminación 44 y un segundo sistema de lentes 45 sobre el chip de cribado de nanopartículas 46. La luz que resulta refractada por el chip de cribado 46 pasa por la pupila de iluminación 44, divisor 43 y un tercer sistema de lentes 47 a través de la apertura 48 de una cámara 49.

5 A título de ejemplo, tal sistema puede comprender:

de Edmund Optics / Thorlabs:

- dos oculares Erfle 41-347 como sistemas de lentes 42 y 45
- cubo divisor de haz de 50 mm 32-704 como divisor de haz 43
- 3-4 lentes PCX (o pares acromáticos) y sistema de montaje de lentes (jaula, ...) para el sistema de lentes 47.

10 La cámara 49 puede ser una cámara CMOS con lentes estándar (f~10 mm)

- AN de obtención de imágenes ajustable desde la lente de la cámara.

Debido a que existe un camino común de obtención de imágenes e iluminación en chip de cribado 46 y divisor de haz 43, pueden producirse algunas reflexiones en la imagen. De hecho, el ángulo de iluminación puede ajustarse mediante desplazamiento de la placa perforada en la pupila de iluminación 44.

15 Leyenda:

- | | |
|----|--|
| 1 | Chip de cribado de nanopartículas |
| 10 | Sustrato |
| 11 | Superficie de trabajo |
| 12 | Zonas |
| 20 | Subzonas |
| 15 | Orificio o surco submicrométrico |
| 20 | Nanopartícula(s) |
| 30 | Flujo de líquido |
| 40 | Configuración de detección de campo oscuro |
| 25 | 41 Fuente de luz |
| | 42 Primer sistema de lentes |
| | 43 Divisor de haz |
| | 44 Pupila de iluminación |
| | 45 Segundo sistema de lentes |
| 30 | 46 Chip de muestras/cribado |
| | 47 Tercer sistema de lentes |
| | 48 Ajuste de AN de obtención de imágenes desde la lente de la cámara |
| | 49 Cámara |

35

REIVINDICACIONES

1. Un chip de cribado de nanopartículas (1) que permite determinar propiedades físicas de nanopartículas (20), en donde el chip de cribado comprende:
5 un sustrato (10) que presenta una superficie de trabajo (11) dividida en una pluralidad de zonas (12), en donde:

 (1) cada una de estas zonas (12) presenta diferentes propiedades superficiales definidas por el componente de energía superficial (d,b,a), definiendo la energía libre total γ_{TOT} de la superficie de cada zona de la manera siguiente:
 $\gamma_{TOT} = \gamma_{LW} + 2(\gamma_+ \gamma_-)^{0.5}$
 en donde los componentes son:
 γ_{LW} = componente dispersivo = d
 γ_+ = componente aceptor de electrones = b
 γ_- = componente donador de electrones = a
 y
15 (2) cada una de estas zonas (12) comprende una pluralidad de subzonas (13), comprendiendo cada subzona una serie de orificios o surcos alargados submicrométricos (15) con un tamaño de apertura diferente (S1, S2, S3, ...).
2. El chip de cribado de nanopartículas (1) según la reivindicación 1, en donde el número de zonas (12) es de 5 a 100, preferiblemente de 10 a 50.
- 20 3. El chip de cribado de nanopartículas según la reivindicación 1 o 2, en donde el número de subzonas (13) es de 2 a 10, preferiblemente de 3 a 6.
4. El chip de cribado de nanopartículas (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el sustrato (10) es un sustrato altamente plano, preferiblemente seleccionado entre vidrio o silicio.
5. El chip de cribado de nanopartículas (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde un espejo dieléctrico unidimensional o un metal noble, preferiblemente oro, ha sido depositado sobre el sustrato (10).
- 25 6. El chip de cribado de nanopartículas (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las propiedades superficiales de al menos una zona han sido modificadas mediante deposición de plasma de una o más capas de al menos un polímero opcionalmente funcionalizado, tal como politetrafluoroetileno, óxido de polietileno o poli(ácido acrílico).
- 30 7. El chip de cribado de nanopartículas (1) según la reivindicación 6, en donde las propiedades superficiales del sustrato (10) han sido modificadas adicionalmente mediante la utilización del autoensamblaje de polielectrolitos, tal como poli(cloruro de dialildimetilamonio) y/o poli(4-estireno sulfonato sódico).
8. El chip de cribado de nanopartículas (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde un número de dichas zonas (12) que presenta diferentes propiedades superficiales comprende una o más capas hidrófobas con una capa hidrófila superficial para incrementar la hidrofobicidad.
- 35 9. Un método de cribado de nanopartículas para determinar propiedades físicas de las mismas, comprendiendo el método las etapas de:

 (a) alimentar nanopartículas en solución/suspensión sobre la superficie de trabajo (11) de un chip de cribado de nanopartículas (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,
40 (b) incubar las nanopartículas en solución sobre la superficie de trabajo (11) durante un tiempo de incubación 't' y después enjuagar el chip de cribado de nanopartículas (1),

 (c) determinar propiedades físicas de las nanopartículas mediante el análisis del chip de cribado de nanopartículas (1) mediante microscopía óptica.
10. El método según la reivindicación 9, en donde en la etapa (b) el tiempo de incubación 't' es de 2 segundos a 60 minutos, preferiblemente de 5 segundos a 45 minutos.
- 45 11. El método según la reivindicación 9 o 10, en donde en la etapa (a) y/o en la etapa (b), se ajusta el pH y/o la concentración salina de la solución o suspensión que contiene nanopartículas.

12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la determinación de las propiedades físicas de las nanopartículas comprende además el cálculo de las propiedades superficiales de las nanopartículas mediante la determinación del equilibrio de energía libre superficial, incluyendo las interacciones electrostáticas y, en particular, los dos componentes de energía superficial:

$$\Delta G_{adh}^{AB} = -2 \left(\sqrt{\gamma_n^{AB}} - \sqrt{\gamma_l^{AB}} \right) \left(\sqrt{\gamma_s^{AB}} - \sqrt{\gamma_l^{AB}} \right)$$

$$\Delta G_{adh}^{LW} = -2 \left(\sqrt{\gamma_n^{LW}} - \sqrt{\gamma_l^{LW}} \right) \left(\sqrt{\gamma_s^{LW}} - \sqrt{\gamma_l^{LW}} \right)$$

en donde AB (LW, respectivamente) representa la interacción ácido-base (de Lifshitz-Van der Waals, respectivamente) y $\gamma_n^{(AB)}$, $\gamma_l^{(AB)}$ y $\gamma_s^{(AB)}$ ($\gamma_n^{(LW)}$, $\gamma_l^{(LW)}$ y $\gamma_s^{(LW)}$, respectivamente) son los componentes ácido base (de Lifshitz-Van der Waals, respectivamente) de las energías superficiales de la nanopartícula (n), medio solución/suspensión (l) y superficie(s) sólida(s) de la zona.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde en la etapa (c) el chip de cribado de nanopartículas (1) se inserta en un dispositivo de lectura que permite determinar ópticamente la presencia y la localización de nanopartículas dentro de las zonas (12) y subzonas (13) de la superficie de trabajo (11), en donde el dispositivo de lectura comprende una fuente de luz (41), un puerto de sujeción dispuesto para sujetar dicho chip de cribado de nanopartículas (1) delante de dicha fuente de luz y un microscopio que permite medir la imagen reflejada de la superficie de trabajo (11), preferiblemente dicho microscopio es un microscopio de campo oscuro, más preferiblemente que incorpora una cámara CCD.

14. Un dispositivo de lectura de chip de cribado de nanopartículas, configurado para determinar ópticamente la presencia y propiedades físicas adicionales de las nanopartículas en un chip de cribado de nanopartículas (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una fuente de luz (41), un puerto de sujeción dispuesto para sujetar dicho chip de cribado de nanopartículas respecto a dicha fuente de luz, un detector de luz y/o un dispositivo de obtención de imágenes, en particular un microscopio capaz de medir una imagen reflejada de la superficie de trabajo completa (11), preferiblemente dicho microscopio presenta una configuración de campo oscuro, más preferiblemente en combinación con una cámara CCD.

15. Uso de un chip de cribado de nanopartículas (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, de un dispositivo de lectura de chip de cribado de nanopartículas según la reivindicación 14 o de un método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 para el control de calidad en procedimiento de fabricación industrial, especialmente en nanomedicina.

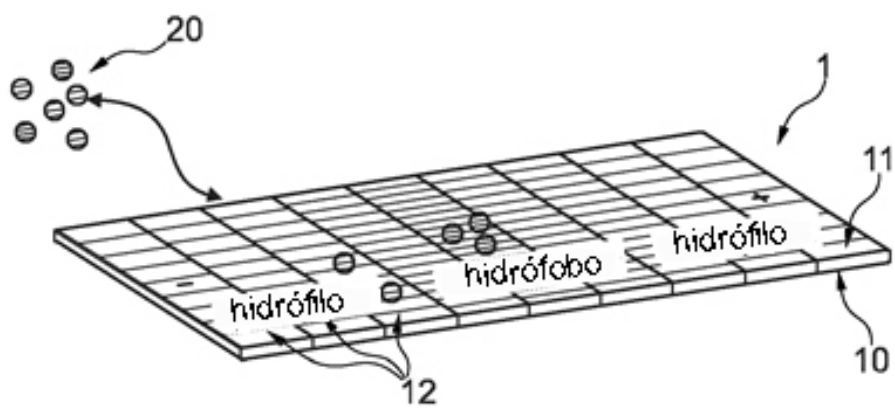


Fig. 1

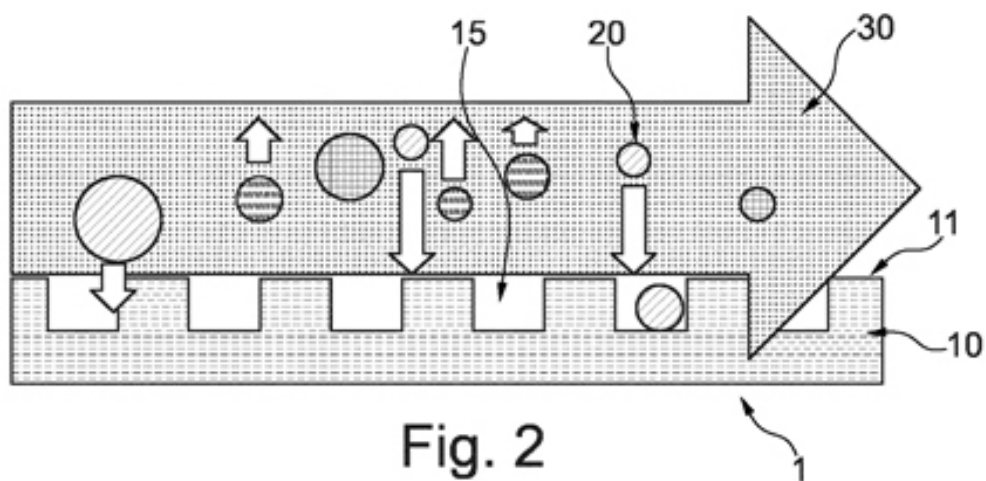


Fig. 2

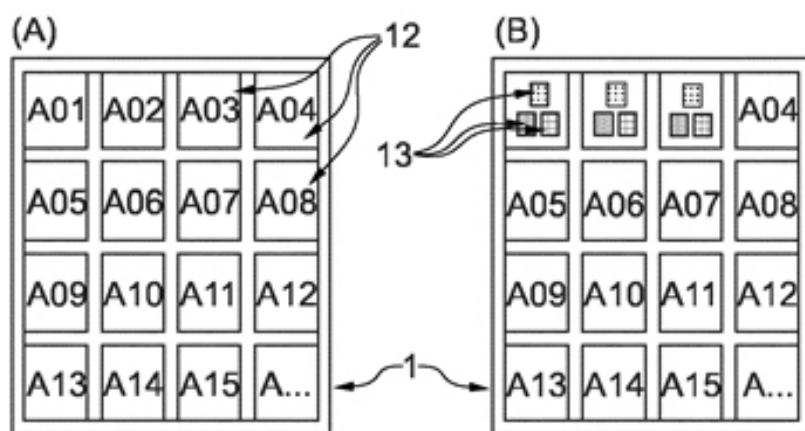


Fig. 3

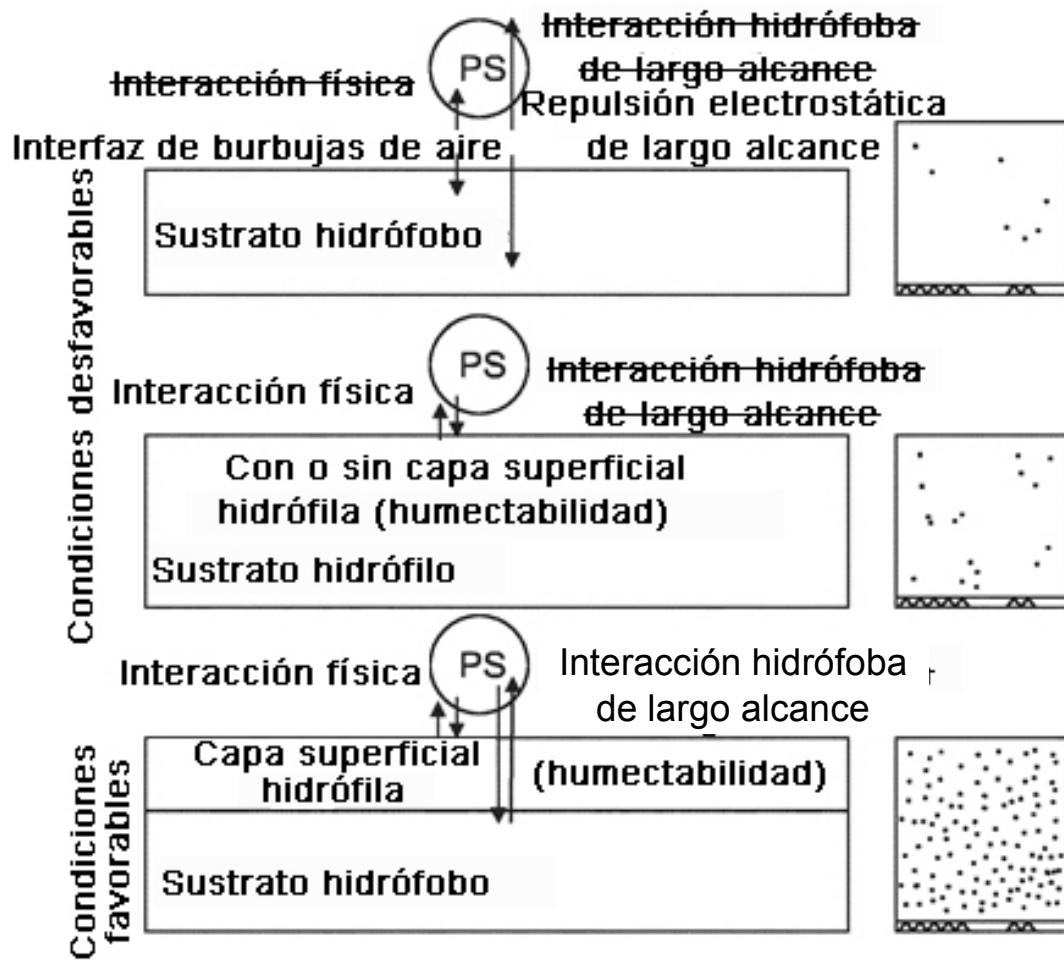


Fig. 4

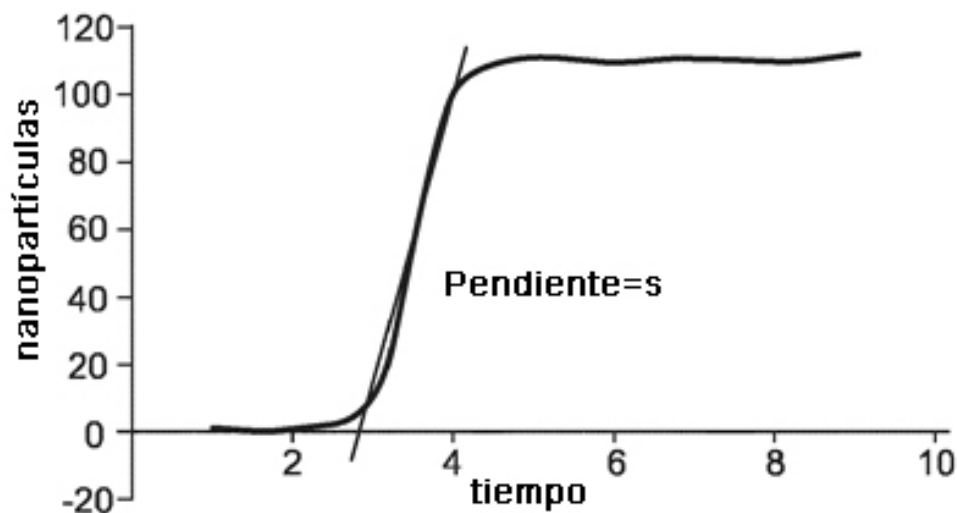


Fig. 5

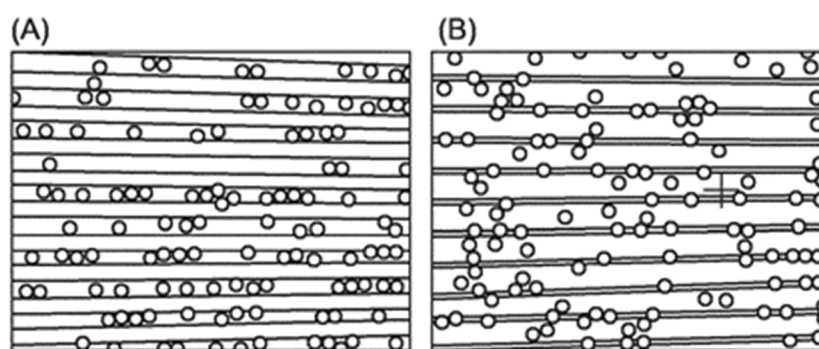


Fig. 6

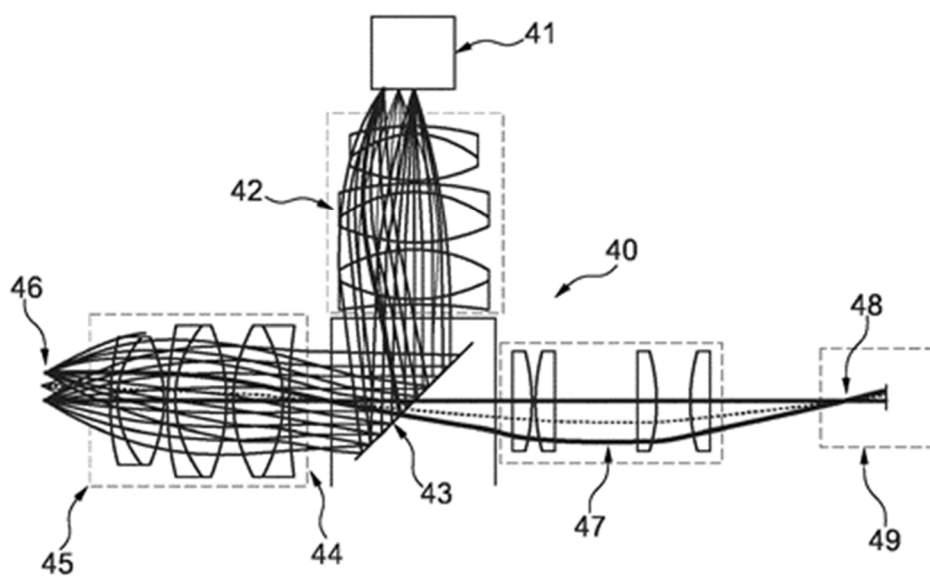


Fig. 7