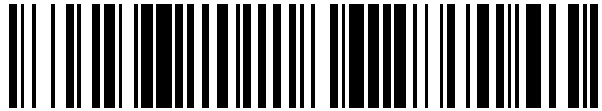


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 665**

21 Número de solicitud: 201330455

51 Int. Cl.:

G01N 23/00 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
B82Y 25/00 (2011.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
C30B 5/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

27.03.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.10.2014

Fecha de la concesión:

01.07.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.07.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (33.3%)
C. Escorxador, s/n
43003 Tarragona (Tarragona) ES;
UNIVERSIDADE DE VIGO (33.3%) y
INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
AVANCATS (33.3%)

72 Inventor/es:

ÁLVAREZ PUEBLA, Ramon Ángel;
MARSAL GARVI, Lluís Francisco;
ALBA MARTÍN, María;
FORMETIN VALLES, Pilar;
GRANERO SECILLA, Pedro;
FERRÉ BORRULL, Josep;
PALLARÉS MARZAL, Josep;
VAZ ARAUJO, Belén;
ÁLVAREZ RODRÍGUEZ, María Rosana;
RODRÍGUEZ DE LERA, Ángel;
CORREA DUARTE, Miguel Ángel;
FERY, Andreas;
PAZOS PÉREZ, Nicolás C. y
TEBBE, Moritz

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

54 Título: **Procedimiento para la fabricación de supercristales coloidales con campos electromagnéticos altamente localizados y su utilización para la detección y monitorización de analitos**

ES 2 502 665 B1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



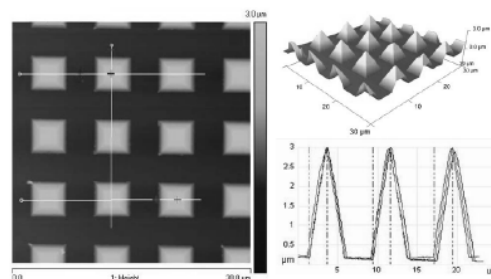
11 Número de publicación: **2 502 665**

21 Número de solicitud: 201330455

57 Resúmen:

Procedimiento para la fabricación de supercristales coloidales con campos electromagnéticos altamente localizados y su utilización para la detección y monitorización de analitos. La invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de supercristales de nanopartículas metálicas que presentan acoplamientos plasmónicos en las tres direcciones. También se refiere a un sensor óptico que contiene dichos supercristales de nanopartículas metálicas con acoplamientos plasmónicos y a la utilización de dicho sensor para la monitorización en continuo de un analito a detectar. El sensor óptico puede ser directo o indirecto y reversible. Con el sensor óptico se soluciona el problema de la degradación en la interfaz durante la monitorización en continuo porque las nanoestructuras piramidales obtenidas requieren una potencia muy baja, del orden de $1 \mu\text{W}$, para detectar y cuantificar la presencia de un analito por SERS.

FIGURA 2



DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA FABRICACIÓN DE SUPERCRIETALES COLOIDALES CON CAMPOS ELECTROMAGNETICOS ALTAMENTE LOCALIZADOS Y SU UTILIZACIÓN PARA LA DETECCION Y MONITORIZACIÓN DE ANALITOS

La presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de supercristales de nanopartículas metálicas que presentan acoplamientos plasmónicos en volúmenes tridimensionales y la localización del campo en la superficie del material. La invención también se refiere al uso de dichos supercristales de nanopartículas con acoplamientos plasmónicos como sensor óptico y al sensor que los contiene para la monitorización en continuo de un analito.

Antecedentes de la invención

La fabricación de materiales ópticos con propiedades macroscópicas es todavía un objetivo a perseguir en el campo de los sensores ópticos. Debido a los requisitos específicos en términos de tamaño y forma, su fabricación es compleja y, con pequeñas excepciones, está restringida a las técnicas de litografía, especialmente a aquellas basadas en el uso de flujos de iones o electrones. Sin embargo, estas técnicas no sólo son muy costosas, sino que también están limitadas a geometrías simples y sólidas, que aun siendo adecuadas para ensayar conceptos, su implementación en la industria tiene muchas dificultades.

Por otro lado, la química coloidal es una tecnología alternativa a la litografía. Durante los últimos años se han descrito algunos ejemplos de fabricación de partículas organizadas para la preparación de dímeros, trímeros y otras partículas coloidales complejas o el uso de coloides previamente preparados para generar entidades cristalinas organizadas denominadas supercristales. En esta dirección, Alvarez-Puebla, R.A. et al. publica "*Gold nanorods 3D-supercrystals as surface enhanced Raman scattering spectroscopy substrates for the rapid detection of scrambled prions*", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 108, 8157-8161 (2011) y Henzie, J., Grünwald, M., Widmer-Cooper, A., Geissler, P.L. & Yang, P. "*Self-assembly of uniform polyhedral silver nanocrystals into densest packings and exotic superlattices*" Nat Mater 11, 131-137 (2012).

También se han descrito nanosensores ópticos para la detección de analitos en solución y gases inorgánicos. En el caso de los gases inorgánicos, estas propuestas dependen de la

fabricación de aleaciones segregadas que contienen plata y oro como materiales ópticamente activos y otro metal, generalmente platino y paladio, como material de captura. Sin embargo, la deposición del metal de captura no sólo dificulta la adsorción del gas en el material óptico con la subsiguiente disminución de sensibilidad, sino que además no es reversible. Una vez el gas es adsorbido en el metal éste no se desorbe, haciendo el sensor de un solo uso. Aunque esta estrategia puede servir para la detección de gases exóticos tales como agentes de guerra química, no es eficaz para la monitorización efectiva de un gas tóxico pero ubicuo como el CO. Un planteamiento alternativo para cumplir con estos requisitos es la monitorización de cambios vibracionales inducidos en sondas secundarias altamente activas por SERS (Espectroscopía Raman aumentada por superficies), directamente unidas al sensor, antes y después de la interacción con la diana o analito a detectar. Así, por ejemplo, es conocida la excelente afinidad y unión reversible de la mioglobina y la hemoglobina con el oxígeno y el monóxido de carbono que, de hecho, es la base para la toxicidad del segundo. Desafortunadamente, la utilización de proteínas en SERS no es la mejor solución ya que estos biopolímeros generalmente se caracterizan por la baja intensidad de su señal.

Por otro lado, la patente europea EP2418170 con título "*Method for aligning colloidal crystals as single crystals*" describe un procedimiento para la alineación de partículas coloidales como cristales individuales que comprende la etapa de fricción de partículas coloidales sobre un sustrato. Este método permite fabricar por concentración un film o película de cristal coloidal en un sustrato. El método permite la fabricación de films de cristales coloidales perfectamente alineados en una, dos o tres dimensiones en estructuras empaquetadas

El método incluye la preparación de un molde, la superficie del cual presenta depresiones o proyecciones capaces de fijar las posiciones y/u orientaciones de una o más partículas; la colocación de las partículas en el molde y la aplicación de una presión física a las partículas para que una parte o el todo de cada partícula quede insertada en cada poro definido por las depresiones o proyecciones para formar una matriz de partículas; y el contacto del molde que tiene la matriz de partículas en un sustrato por impresión de manera que la matriz de partículas se transfiere al sustrato de impresión.

Por otro lado, la patente europea EP1827674 con título "*Colloidal photonic crystals using colloidal nanoparticles and method for preparation thereof*" describe un procedimiento para la preparación de cristales fotónicos coloidales utilizando nanopartículas coloidales mediante

la adición de un material viscoelástico (PDMS) en una solución que contiene las nanopartículas coloidales cuando se preparan los cristales fotónicos coloidales, de manera que tiene lugar una contracción volumétrica uniforme debido a la elasticidad del material viscoelástico incluso cuando no tiene una contracción volumétrica uniforme durante el
5 secado de un medio de dispersión en la solución coloidal. Así, es posible preparar cristales fotónicos coloidales de 2 ó 3 dimensiones de gran escala sin defectos. Estos cristales fotónicos son adecuados para utilizar en láser, sensores, sensores piezoeléctricos, servomotores, membranas de separación cromatográfica, portadores de catalizadores, circuitos integrados ópticamente, filtros ópticos, capas de alineación de cristales líquidos,
10 membranas repelentes al agua o super hidrofílicas, fotomáscaras, películas de antireflexión y dispositivos indicadores, etc, los cuales requieren cristales fotónicos.

Sin embargo, a la vista del estado de la técnica, no existe todavía un sensor óptico con supercristales de nanopartículas con acoplamientos plasmónicos apto para la monitorización
15 en continuo de un analito.

Breve descripción de la invención

Con el procedimiento para la fabricación de supercristales de nanopartículas metálicas ordenadas con acoplamientos plasmónicos en las tres direcciones de acuerdo con la
20 invención se consiguen resolver los inconvenientes citados, presentando además otras ventajas que se describirán a continuación.

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación de
25 supercristales de nanopartículas metálicas que se caracteriza por el hecho de que comprende las siguientes etapas:

- a) preparar una solución coloidal de nanopartículas metálicas;
- b) estructurar un sustrato para obtener un molde provisto de cavidades con la geometría deseada invertida susceptibles de conformar supercristales
30 nanoestructurados con dicha geometría;
- c) hidrofilar la superficie del molde y sus cavidades para inducir un mojado homogéneo; alternatively, hidrofilar disponiendo sobre la superficie del molde y sus cavidades un polímero hidrofílico susceptible de facilitar el desmoldeo de los supercristales nanoestructurados con la estructura deseada
35 una vez conformados;
- d) verter la solución coloidal preparada en la etapa a) sobre el molde hidrofalizado de

modo que la solución coloidal es susceptible de quedar confinada dentro de las cavidades hidrofílicas con la geometría deseada invertida;

e) dejar sedimentar las nanopartículas metálicas en las condiciones ambientales adecuadas para conformar supercristales nanoestructurados con la geometría deseada; e

f) imprimir directamente los supercristales nanoestructurados con la geometría deseada sobre un sustrato de modo que se obtiene un conjunto de supercristales nanoestructurados plasmónicos soportados por el sustrato.

10 Opcionalmente, el procedimiento además comprende:

g) funcionalizar la superficie del supercristal con una molécula o biomolécula susceptible de poseer afinidad por un analito a detectar.

15 En un segundo aspecto, la invención proporciona un sensor o biosensor óptico directo o indirecto, reversible, o en caso de interés no reversible, que comprende un conjunto de supercristales nanoestructurados con la geometría deseada generada por nanopartículas metálicas ordenadas donde dichos supercristales están soportados por un sustrato.

20 Y en un tercer aspecto, la invención se refiere a la utilización del sensor o biosensor óptico directo o indirecto, reversible, o en caso de interés no reversible, que comprende dichos supercristales nanoestructurados con la geometría deseada para la monitorización en continuo de un analito.

Breve descripción de las figuras

25 Para mejor comprensión de cuanto se ha expuesto se acompañan unos dibujos en los que, esquemáticamente y sólo a título de ejemplo no limitativo se representa un caso práctico de realización.

30 La Figura 1 muestra ejemplos de diferentes moldes de silicio con cavidades de geometría piramidal invertida y diferentes tamaños. Estos moldes y sus cavidades se han obtenido por litografía láser sobre una oblea de silicio. En dicha figura 1 puede observarse que el tamaño del lado de la pirámide puede variar desde 1,2 μm (segunda imagen) hasta 10,5 μm (última imagen). Así pues, con el procedimiento según el primer aspecto de la invención pueden
35 diseñarse cavidades con estructura piramidal invertida del tamaño deseado.

La Figura 2 muestra las imágenes de microscopia de fuerza atómica del sustrato que comprende un conjunto de supercristales nanoestructurados con partículas de oro ordenadas en una estructura piramidal.

5 La figura 3 es una representación esquemática de un sensor de CO que comprende un sustrato con supercristales piramidales plasmónicos funcionalizados con porfirina metalizada con hierro. La figura 3A muestra la espectroscopia UV-Vis-NIR de la porfirina antes y después de la metalización con Fe(II). La figura 3B muestra el espectro SERS de una porfirina libre, coordinada con hierro y complejada con CO. Las flechas en el espectro
10 destacan los cambios espectrales después de complejar el CO. Todos los espectros se obtuvieron con un macrosistema Raman portátil (condiciones λ_{ex} : 785 nm, 1s, energía en la muestra 1 mW y resolución espacial de 1mm).

La figura 4 muestra la deconvolución de las bandas a 1516 y 1552 cm^{-1} (Fig. 4A), donde el
15 trazado del área de banda con respecto a la concentración de CO muestra una correlación lineal, con una pendiente R^2 de 0,9917 (Fig. 4B), que demuestra la naturaleza cuantitativa del método de análisis. Además, bajo condiciones atmosféricas normales, la señal disminuye con el tiempo (Fig. 4C) debido a la competencia entre el CO y el O_2 . Después de aproximadamente 20 min, la señal desaparece. Sin embargo, solo después de 5 min, la
20 señal disminuye por debajo de 20 ppm CO, un nivel tolerable para los humanos. Tal y como se muestra en la figura Fig. 4D el sensor siempre se recuperó en menos de 5 min de exposición al aire, lo que permite la monitorización en continuo de este gas en un entorno de forma reversible.

25 **Descripción detallada de la invención**

La invención, en su primer aspecto, proporciona un procedimiento para la fabricación de supercristales de nanopartículas metálicas que se caracteriza por el hecho de que comprende las etapas reivindicadas en la reivindicación 1 adjunta.

30

Para obtener los supercristales de nanopartículas metálicas ordenadas con acoplamientos plasmónicos en las tres dimensiones son especialmente esenciales las etapas b) y c) del procedimiento.

35 Etapa b)

En primer lugar debe seleccionarse el tipo de sustrato que se va a estructurar.

El sustrato susceptible de modelarse a la geometría invertida deseada puede ser de silicio, un elastómero o una resina.

5 La estructuración del sustrato permite obtener un molde provisto de cavidades con la geometría deseada invertida, siendo dichas cavidades susceptibles de conformar supercristales nanoestructurados con la geometría definida por dichas cavidades.

La estructuración del sustrato puede llevarse a cabo por fotolitografía, haces de electrones, rayos X o haces de iones, siendo la litografía óptica o fotolitografía la tecnología preferida.
10 Las técnicas citadas son de conocimiento general para un experto en la materia y la puesta en práctica de las mismas forma parte de la práctica general de un experto en la materia.

En una realización de la invención, el sustrato a estructurar es una oblea de silicio.

Para estructurar la oblea de silicio se procedió como sigue:

- 15
- La oblea de silicio se oxida para obtener un film o película de óxido de silicio (SiO_2) susceptible de actuar de máscara o capa protectora;
 - La oblea de silicio se cubre con una resina fotoresistente positiva y se expone a la luz para transferir la imagen positiva.
 - Se elimina la fotoresina expuesta y el film o película de óxido de silicio se ataca
20 obteniendo la base de la pirámide invertida sobre el silicio;
 - Se retira la resina fotoresistente restante;
 - El silicio se ataca anisotrópicamente para obtener las cavidades con la geometría de pirámide invertida; y finalmente
 - Se retira la capa de óxido restante.
- 25

Esta etapa proporciona un molde de silicio con un patrón periódico con pirámides invertidas homogéneas, la dimensión de las cuales puede variar en función del tiempo de ataque anisotrópico.

30 El molde resultante es una red o matriz provista de cavidades con la geometría piramidal invertida.

En otra realización, se obtuvo una réplica del molde y sus cavidades en un elastómero (PDMS). Para ello, se hizo una doble réplica del sustrato estructurado de silicio con el
35 elastómero PDMS. En otra realización, se utiliza una resina.

Etapa c)

En primer lugar, se hidrofilita la superficie del molde y sus cavidades permitiendo inducir un mojado homogéneo en el molde y sus cavidades.

- 5 La hidrofilitación de la superficie del molde y sus cavidades se lleva a cabo mediante oxidación superficial del molde de silicio o del molde de PDMS con un plasma con oxígeno.

Alternativamente, puede hidrofilitarse la superficie del molde y sus cavidades disponiendo un polímero hidrofílico sobre el molde antes de verter la solución coloidal preparada en la etapa a) de manera que la solución coloidal es susceptible de quedar confinada dentro del polímero hidrofílico dentro de las cavidades del molde.

A continuación, se vierte la solución coloidal preparada en la etapa a). La solución coloidal preparada en la etapa a) comprende nanopartículas metálicas, preferiblemente nanopartículas de oro.

Y se prosigue con las etapas d), e) y f) descritas más arriba que permiten obtener un conjunto de supercristales nanoestructurados de partículas metálicas ordenadas con la geometría deseada soportadas por un sustrato.

A partir de un análisis de las pirámides formadas, los autores de la presente invención han demostrado que cuando los nanocristales están todos juntos y comprimidos en el interior de las cavidades piramidales invertidas, la densidad del conjunto excede de un valor crítico lo que provoca una ordenación espontánea de los nanocristales en un supercristal con el diseño de la cavidad invertida. Esta transición en el ordenamiento está dirigida por la entropía.

Así pues, el procedimiento según el primer aspecto de la invención permite obtener un sustrato macroscópico consistente en un conjunto de pirámides ordenadas de nanopartículas metálicas ordenadas que tienen aplicación como sensor óptico reversible para la detección y/o monitorización en continuo de un analito.

Ventajosamente, de acuerdo con el primer aspecto de la invención se proporcionan supercristales de geometría piramidal ordenada con acoplamientos plasmónicos en las tres direcciones y campos electromagnéticos altamente localizados en la superficie. La presente

invención también contempla la obtención de otras geometrías tales como pilares de base cuadrada o pilares de base circular. Es sabido que la geometría fotónica más eficiente es la pirámide y, por lo tanto, es la geometría preferible para un sensor o biosensor óptico de acuerdo con la presente invención.

5

En un segundo aspecto, la invención proporciona un sensor o biosensor óptico directo o indirecto reversible que comprende un conjunto de supercristales piramidales de nanopartículas metálicas ordenadas soportados por un sustrato.

10 Preferiblemente, dicho sustrato que comprende el conjunto de supercristales piramidales se selecciona entre una oblea de silicio, vidrio, Tesafilm o PDMS curado.

Alternativamente, el sensor o biosensor óptico puede funcionalizarse con una molécula o biomolécula. La selección del tipo de molécula o la selección del tipo de biomolécula se
15 realizará en función de la afinidad de dicha molécula o biomolécula por el analito a detectar.

En la invención, por “analito” se entiende una especie atómica o molecular presente en un fluido líquido o gaseoso susceptible de ser analizado.

20 Así pues, de acuerdo con la invención, es posible funcionalizar las superficies plasmónicas con una molécula o biomolécula.

En una realización de la invención se funcionalizaron las superficies piramidales plasmónicas con porfirina coordinada con Fe, que posee una elevada afinidad de unión a
25 gases atmosféricos. Ventajosamente, para forzar una orientación perpendicular de estas moléculas sobre las pirámides que mejore la eficacia de captura de los gases atmosféricos fue necesario su funcionalización con un solo tiol en un lugar de unión periférico de la porfirina. Se sintetizó 5-[(trisisopropilsilil)tio]-10,20-difenilporfirina (TDPP), metalizada con Fe(II) y se ensambló sobre la pirámides de nanopartículas de oro. El espectro de SERS
30 mostró la TDPP libre, coordinada con Fe(II) y complejada con CO. El espectro mostró claramente cambios espectrales antes y después de complejarse con CO. Véase Figura 3.

Ventajosamente, con el sensor óptico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención es posible obtener información cuantitativa de la cantidad de CO presente en un entorno y en
35 un momento dado.

Los límites y rangos de detección de estos sensores indirectos dependen estrictamente de la cantidad de moléculas sensoras en la superficie plasmónica de las estructuras piramidales fabricadas. La cantidad de moléculas requeridas para una buena señal en SERS también depende de la sección transversal en SERS de la molécula sonda. La TDPP-Fe, como cualquier porfirina, se caracteriza por una elevada sección transversal en SERS, con capacidad para la detección de la molécula simple.

En relación a la concentración de CO en un entorno determinado se sabe que la exposición a 500 ppm de CO durante una hora puede ser fatal, mientras que 100 ppm provoca dolor de cabeza y somnolencia y que 50 ppm induce el deterioro en la capacidad motora; sin embargo, por debajo de 40 ppm no existen síntomas.

Por lo tanto, con el fin de proporcionar un rango de límite de detección entre 1 y 100 ppm se estudió el efecto de distintas cantidades de moléculas TDPP-Fe sobre el sustrato con las pirámides.

Se obtuvieron resultados óptimos cuando se depositó por "spin-coating" 10 μL de una solución 3×10^{-6} M de TDPP-Fe por cm^2 de superficie de la pirámide.

Bajo microscopio Raman, esta concentración proporcionó señales SERS muy intensas con muy baja potencia (1 μW) y un tiempo de 10 ms gracias a la extraordinaria actividad óptica de las pirámides. Por ello, estos sustratos permiten el uso de sistemas Raman portátiles para determinaciones macroscópicas. Véase Figura 4.

El sensor o biosensor óptico comprende un sustrato provisto de un conjunto de microestructuras piramidales compuestas de nanopartículas metálicas plasmónicas soportadas en él que generan una respuesta espectroscópica medible cualitativa y cuantitativamente cuando incide una fuente lumínica en la superficie del sustrato y todo ello con una potencia mínima lo que permite la miniaturización de este tipo de sensor óptico reversible. Ventajosamente, la fuente luminosa es un láser de bajo coste, un conjunto de leds o cualquier otra fuente de iluminación monocromática con una potencia mínima.

Por lo tanto, con el nuevo sensor óptico se soluciona el problema de la degradación en la interfaz de detección durante la monitorización en continuo porque las nanoestructuras piramidales preparadas requieren una potencia muy baja (1 μW) comparada con la necesaria para detectar y cuantificar la presencia de un analito por SERS en los sensores ópticos del

estado de la técnica.

Con la invención se resuelve, por un lado, el problema de la degradación de la interfase de detección de un sensor óptico durante la monitorización en continuo para la detección y cuantificación de un analito y, por el otro, el problema de nanoestructurar nanopartículas presentando acoplamientos plasmónicos en las tres dimensiones.

EJEMPLO

Fabricación de un sensor óptico que comprende una oblea de silicio y un conjunto de supercristales soportados donde dichos supercristales están formados de nanopartículas de oro ordenadas formando una estructura piramidal

- Etapa a)

Para la síntesis de nanopartículas de oro se prepararon nanopartículas de oro esféricas altamente monodispersas (~70 nm). Se preparó una solución para cristalización mezclando una solución acuosa (20 mL) que contenía HAuCl_4 ($2,5 \times 10^{-4}$ M, Aldrich) y citrato sódico dihidrato ($2,5 \times 10^{-4}$ M, Aldrich). La mezcla se agitó vigorosamente mientras se añadía NaBH_4 (0,1 M, 600 μL , Aldrich). Se observó un rápido cambio de color después de la adición de NaBH_4 indicando la formación de partículas de oro. A continuación, se disolvió CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) en agua milli-Q (0,1 M, 250 mL) y 0,3 mg por kg de CTAB de yoduro de potasio (Aldrich). Se añadió HAuCl_4 (0,103 M, 1271 μL) y ácido ascórbico (0,1 M, 2088 μL , Aldrich). Después de cada adición, el matraz se agitó enérgicamente. Después, se añadieron 500 μL de solución de semillas a la solución de crecimiento y se agitó vigorosamente. La botella se dejó reposar a 28 °C durante 48 h. Se recogió el sobrenadante cuidadosamente, y se rechazó el precipitado. Las partículas de oro (200 mL) se concentraron por centrifugación (4 x 7000 rpm, 15 min) hasta un volumen total de 2 mL. Entonces, la concentración de CTAB se disminuyó de 0,1 M hasta una concentración final de 0,006 M por dilución de 100 μL de la solución de oro concentrada con agua (1,7 mL). Finalmente, se llevó a cabo una etapa de centrifugación (6000 rpm, 10 min) para conseguir una concentración de oro final de 3,5 mg/mL.

Forma parte del conocimiento general de un experto en la materia la preparación de una solución coloidal de partículas metálicas, por lo que el método detallado expuesto más arriba es solo a título de ejemplo para la preparación de una solución coloidal de partículas de oro.

- Etapa b)

El sustrato a estructurar fue una oblea de silicio que se oxidó con oxígeno seco a 1000 °C durante 15 min con el fin de desarrollar una película de dióxido de silicio (SiO₂). La película de óxido sirvió de máscara y como capa protectora para el subsiguiente ataque anisotrópico del silicio con una solución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH, Aldrich). A continuación, se utilizó la técnica de litografía óptica o de escritura directa por láser para definir las cavidades en el sustrato. Se utilizó una resina fotoresistente positiva con un revelador libre de iones metálicos. El modelo litográfico se transfirió a la capa de óxido por ataque del óxido de silicio con ácido fluorhídrico tamponado. Después, la resina fotoresistente se retiró y las obleas de silicio se sumergieron en una solución al 8% de TMAH, a 80 °C de temperatura, durante 7-9 min con el fin de obtener las cavidades invertidas en la superficie de la oblea. Después del ataque con TMAH ya no era necesaria la capa de óxido por lo que ésta se retiró con una solución al 5% de HF. En esta realización, se obtuvieron pirámides invertidas de periodo 8 μm para generar una pirámide de 4,5 μm de lado y 3,3 μm de altura.

- Etapas c) – f)

La preparación de la red o matriz nanoestructurada piramidal se llevó a cabo como sigue. Con el fin de limpiar las superficies de las cavidades invertidas y hacerlas hidrofílicas, éstas se trataron con plasma de oxígeno, 0,2 mbar, a 0,1 kW y 2 min en un Flecto10, utilizando la tecnología de Plasma.

A continuación, 0,05 mL de la solución de partículas de oro concentrada preparada en la etapa a) se vertió sobre el molde hidrofílicado de modo que la solución coloidal quedó confinada entre las paredes del molde hidrofílico, dentro de las cavidades con geometría piramidal invertida.

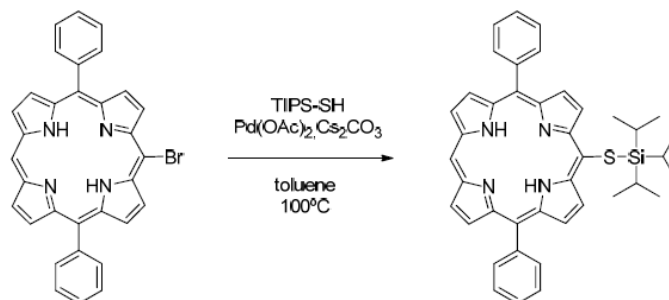
El sistema se dejó en una cámara con humedad controlada (99 %) hasta la sedimentación de las partículas (24 h). A continuación, el sistema se retiró de la cámara de humedad y se dejó secar.

Seguidamente, se llevó a cabo la impresión directa del conjunto de pirámides en un sustrato tal como una oblea de silicio, vidrio, Tesafilm o PDMS curado.

35

- Etapa g)

La funcionalización de la superficie del supercristal se llevó a cabo con porfirina, molécula con afinidad por el CO. En primer lugar, se sintetizó la porfirina por cualquier método conocido por un experto en la materia hasta obtener la TDPP (5-[(trisisopropilsilil)tio]-10,20-difenilporfirina).



A continuación, se metalizó la porfirina añadiendo concentraciones equimoleculares de porfirina y acetato de hierro (II) dihidrato a una solución de 5:1 diclorometano/metanol. La solución se calentó durante 30 min y, a continuación, se dejó en agitación durante toda la noche bajo atmósfera de nitrógeno. Entonces, se vertieron 10 μL de soluciones diluidas de TDPP-Fe (3×10^{-5} , 3×10^{-6} , 3×10^{-7} , 3×10^{-8} , 3×10^{-9} , 3×10^{-10} o 3×10^{-11} M) en el conjunto de pirámides impresas sobre la oblea de silicio (1 cm^2) y se dejó secar al aire. El biosensor se probó en atmósferas puras de CO (Air Liquide) con el sistema Raman manual para establecer la cantidad necesaria de TDPP-Fe para detectar cuantitativamente el gas en el rango de detección comprendido entre 1 y 400 ppm. Entonces, se ensayó el sensor en una cámara cerrada que contenía la atmósfera normal y se controló la cantidad de CO de una mezcla comercial de CO (100 ppm) en N_2 (Air Liquide) con la ayuda de un manorreductor y un medidor de flujo de gas. Se estudió la reversibilidad del sensor por exposición del sensor varias veces a atmósferas que contenían 100 ppm de CO y aire limpio. Véase Figura 4.

A pesar de que se ha hecho referencia a una realización concreta de la invención, es evidente para un experto en la materia que el procedimiento para la fabricación de supercristales estructurales de nanopartículas metálicas ordenadas y el sensor que los contiene descrito más arriba es susceptible de numerosas variaciones y modificaciones, y que todos los detalles mencionados pueden ser substituidos por otros técnicamente equivalentes, sin apartarse del ámbito de protección definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la fabricación de supercristales de nanopartículas metálicas, **caracterizado** por el hecho de que comprende las siguientes etapas:
 - a) preparar una solución coloidal de nanopartículas metálicas;
 - 5 b) estructurar un sustrato para obtener un molde provisto de cavidades con la geometría deseada invertida susceptibles de conformar supercristales nanoestructurados con la geometría deseada;
 - c) hidrofilar la superficie del molde y sus cavidades para inducir un mojado homogéneo;
 - 10 d) verter la solución coloidal preparada en la etapa a) sobre el molde hidrofilarizado de modo que la solución coloidal es susceptible de quedar confinada entre las paredes hidrofílicas de las cavidades con la geometría deseada invertida;
 - e) dejar sedimentar las nanopartículas metálicas en las condiciones ambientales adecuadas para conformar supercristales nanoestructurados con la geometría deseada; e
 - 15 f) imprimir directamente los supercristales nanoestructurados con la geometría deseada sobre un sustrato de modo que se obtiene un conjunto de supercristales nanoestructurados plasmónicos soportados por el sustrato.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde además comprende:
 - g) funcionalizar la superficie del supercristal con una molécula o biomolécula susceptible de poseer afinidad por un analito a detectar.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la geometría deseada es una estructura
25 piramidal.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, donde en la etapa c) se hidrofilariza la superficie del molde y sus cavidades mediante oxidación con un plasma con oxígeno.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 1, donde en la etapa c) se hidrofilariza la superficie del molde y sus cavidades añadiendo un polímero hidrofílico sobre el molde y sus cavidades antes de verter la solución coloidal preparada.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el sustrato a estructurar para obtener el
35 molde provisto de cavidades es de silicio, un elastómero, una resina o cualquier otro material susceptible de ser litografiado.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el sustrato que soporta los supercristales nanoestructurados se selecciona entre una oblea de silicio, vidrio, Tesafilm, o un material viscoelástico curado tal como el PDMS curado.

5

8. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha molécula o biomolécula es porfirina, proteína, péptido, lípido, ADN, ARN.

9. Sensor óptico que comprende un conjunto de supercristales nanoestructurados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la detección de un analito.

10

10. Sensor según la reivindicación 9, donde dicho sensor es indirecto.

11. Sensor según la reivindicación 9, donde dicho sensor es reversible.

15

12. Sensor según la reivindicación 9, donde dicho analito es cualquier especie atómica o molecular.

13. Sensor según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para la monitorización continua de un analito.

20

14. Sensor según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde la fuente luminosa para detectar el analito es un láser, un led o cualquier otra fuente de iluminación monocromática con una potencia de alrededor de $1\mu\text{W}$.

25

FIGURA 1

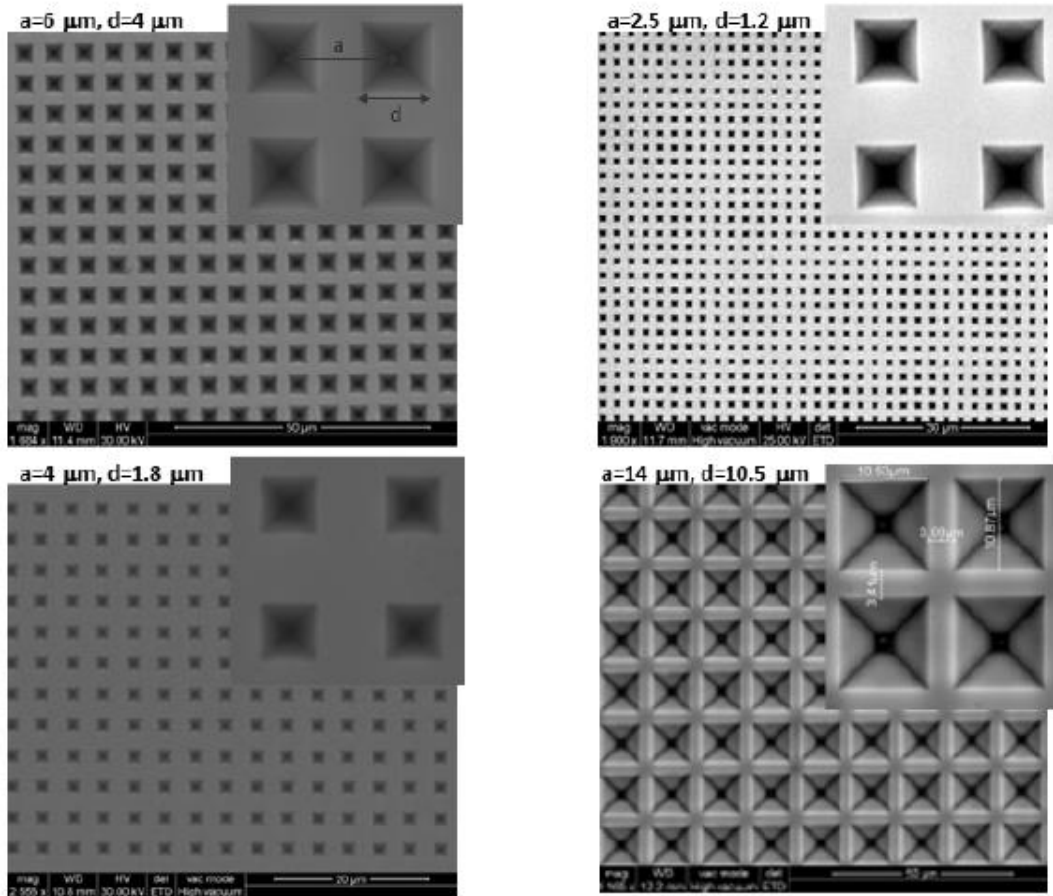


FIGURA 2

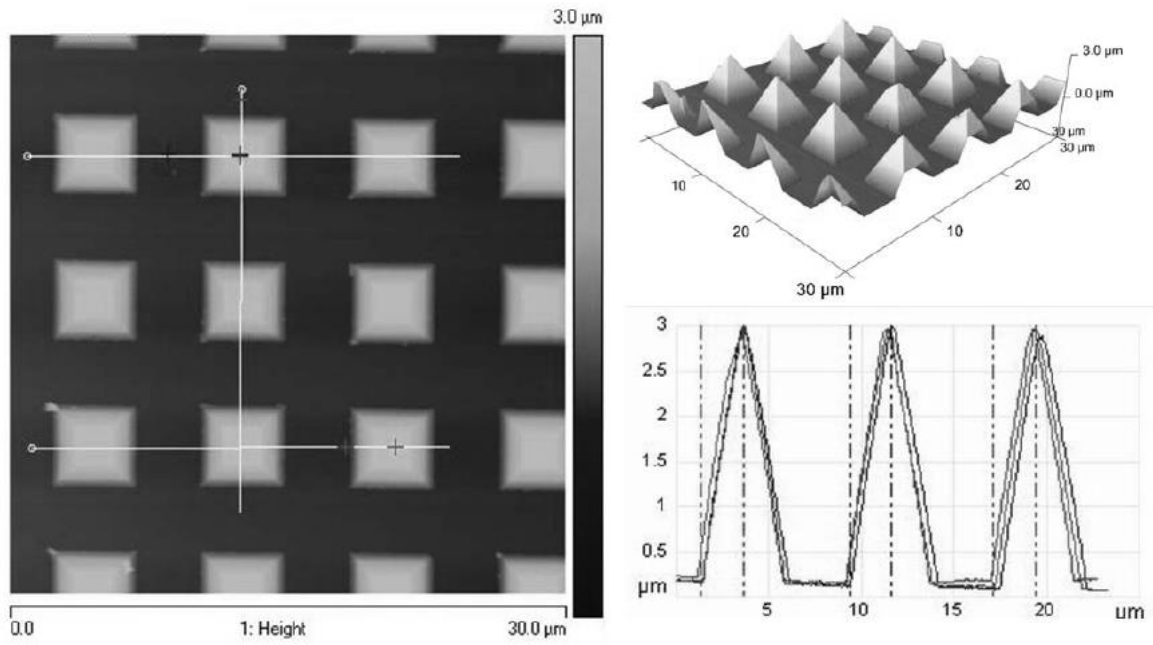
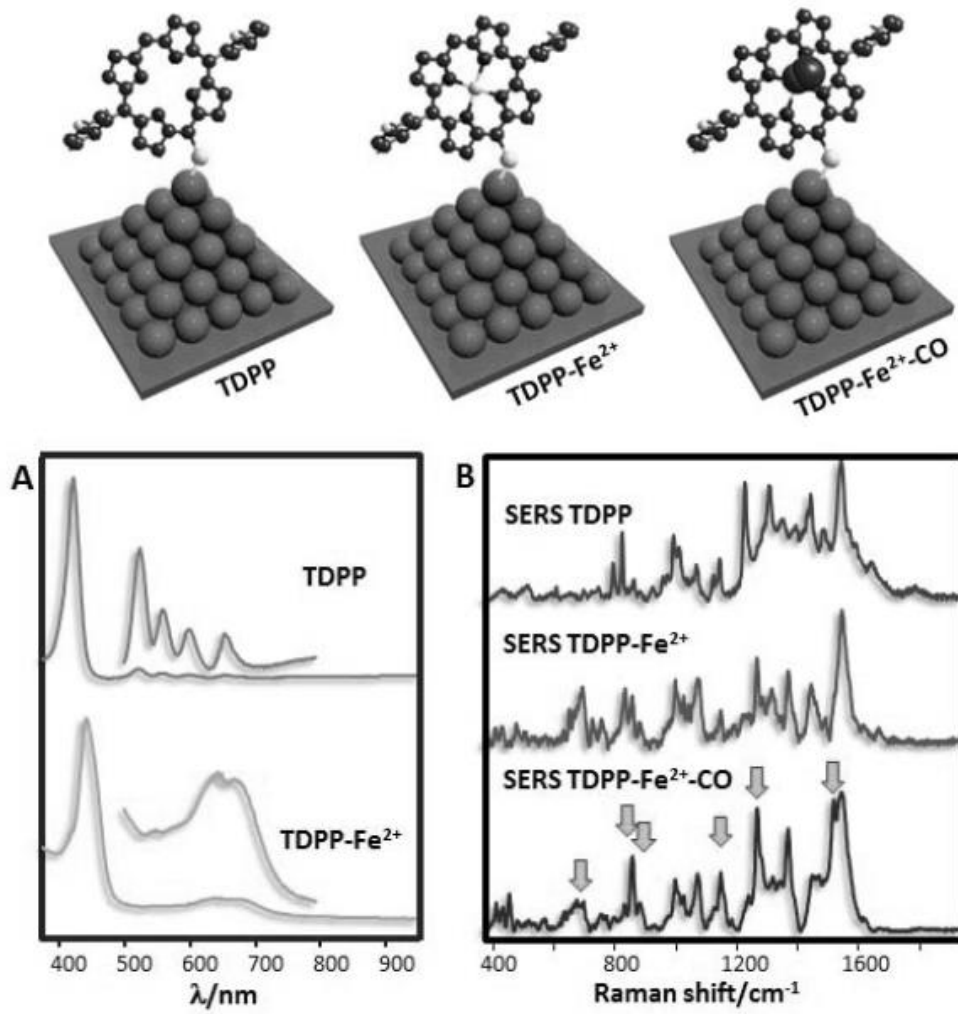
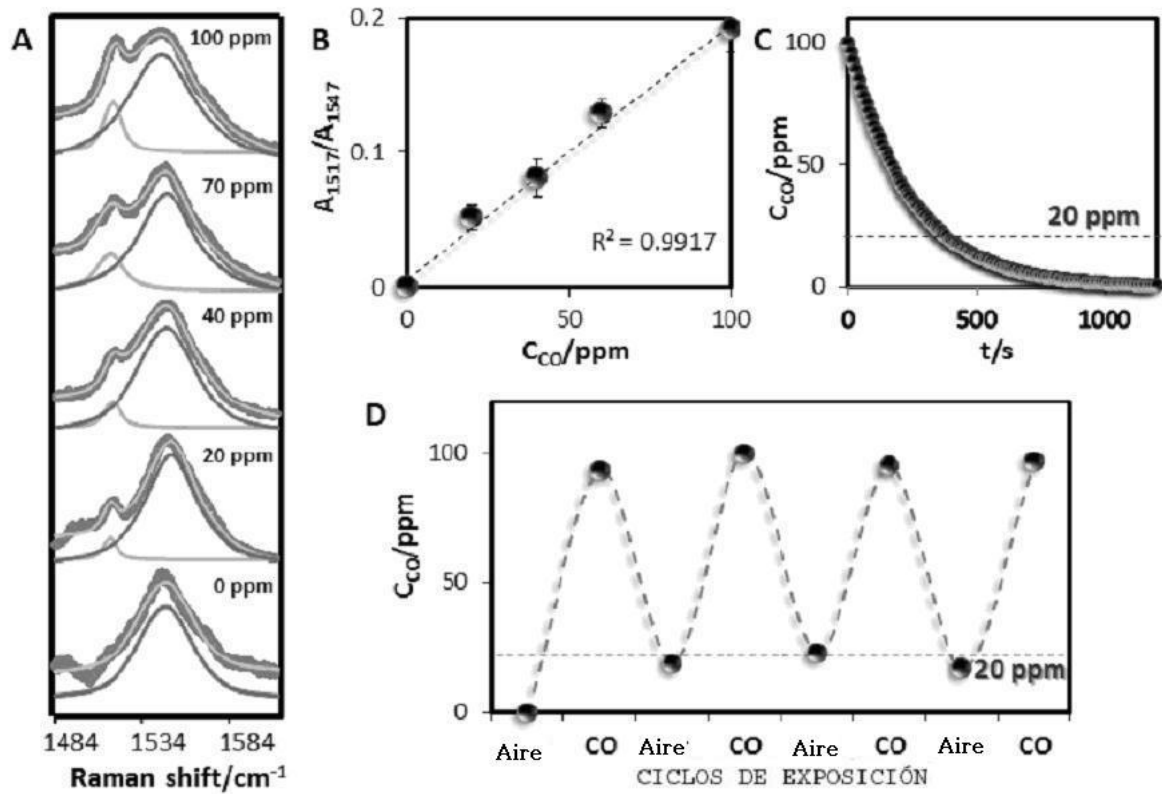


FIGURA 3



□

FIGURA 4





- ②① N.º solicitud: 201330455
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.03.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CUI, B., et al. Fabrication of large area nanoprism arrays and their application for surface enhanced Raman spectroscopy. Nanotechnology, 2008, vol. 19, no 14, p. 145302; apartados 2-3.	1-14
A	ZHENG, Jiwen, et al. Nanopatterned assembling of colloidal gold nanoparticles on silicon. Langmuir, 2000, vol. 16, no 10, p. 4409-4412; Experimental Section.	1-14
A	CHOI, Inhee; HUH, Yun Suk; ERICKSON, David. Size-selective concentration and label-free characterization of protein aggregates using a Raman active nanofluidic device. Lab on a Chip, 2011, vol. 11, no 4, p. 632-638; apartados 2.2-3.2.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.01.2014

Examinador
V. Balmaseda Valencia

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N23/00 (2006.01)

B82Y30/00 (2011.01)

B82Y25/00 (2011.01)

B82Y40/00 (2011.01)

C30B5/00 (2006.01)

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

C30B, B82Y, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.01.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CUI, B., et al. Nanotechnology Vol. 19, Nº 14, p. 145302.	2008
D02	ZHENG, Jiwen, et al. Langmuir, vol. 16, no 10, p. 4409-4412.	2000
D03	CHOI, Inhee; HUH, Yun Suk; ERICKSON, David. Lab on a Chip, vol. 11, no 4, p. 632-638.	2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente invención es un procedimiento para la fabricación de supercristales de nanopartículas metálicas y un sensor óptico que comprende un conjunto de dichos supercristales.

El documento D01 describe un procedimiento de fabricación de redes nanoprismáticas de gran superficie y su aplicación en Espectroscopia Raman aumentada por superficies. Dicho procedimiento comprende estructurar un sustrato (oblea de silicio) para obtener un molde provisto de cavidades prismáticas invertidas, hidrofilar la superficie del molde y sus cavidades mediante oxidación con un plasma con oxígeno. Sobre dicho sustrato se conforman redes nanoprismáticas de oro y plata de manera independiente para detección de rodamina por Espectroscopia Raman aumentada por superficies (apartados 2 y 3).

En el documento D02 se estudia el ensamblaje nanoestructurado de partículas coloidales de oro sobre silicio. Dicho ensamblaje comprende preparar una solución coloidal de nanopartículas de oro y estructurar un sustrato mediante el pretratamiento de una oblea de silicio, su funcionalización con octadeciltriclorosilano y la oxidación localizada del mismo. Sobre dicho sustrato se deposita la solución coloidal de nanopartículas de oro (Experimental Section).

El documento D03 divulga un dispositivo nanofluídico activo en Espectroscopia Raman aumentada para la caracterización y concentración de proteínas. Dicho dispositivo se fabrica a partir de la inmovilización de nanopartículas de oro sobre una placa de vidrio previamente modificada con 3-aminopropiltrimetoxisilano y su unión mediante oxidación por plasma a una oblea de silicio previamente estructurada (apartado 2.2-3.2).

Ninguno de los documentos D01-D03 ni cualquier combinación relevante de los mismos divulga un procedimiento para la fabricación de supercristales de nanopartículas metálicas que comprenda las etapas recogidas en las reivindicaciones 1-8. Así mismo, tampoco divulga un sensor óptico que comprenda un conjunto de dichos supercristales nanoestructurados (reivindicaciones 9-14). Además, no serían obvios para un experto en la materia a partir de los documentos citados.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-14 es nuevo e implica actividad inventiva conforme establecen los Artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.