

## **SUSTANCIAS CATALÍTICAMENTE ACTIVAS**

### REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio en la solicitud provisional de Estados Unidos con número de serie 62/609.370, presentada el 22 de diciembre de 2017, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

### ANTECEDENTES

Las matrices biológicas se encuentran entre una amplia gama de herramientas usadas para detectar y analizar moléculas, incluyendo ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). En estas aplicaciones, las matrices están diseñadas para incluir sondas para secuencias de nucleótidos presentes en genes de humanos y otros organismos. En determinadas aplicaciones, por ejemplo, las sondas individuales de ADN y ARN se pueden unir en ubicaciones en una cuadrícula geométrica (o aleatoriamente) en un soporte de matriz. Una muestra de ensayo, por ejemplo, de una persona u organismo, puede estar expuesta a la cuadrícula, de modo que los fragmentos complementarios hibridan con las sondas en los sitios individuales de la matriz. La matriz se puede examinar escaneando frecuencias específicas de luz sobre los sitios para identificar qué fragmentos están presentes en la muestra, por fluorescencia de los sitios en donde los fragmentos hibridaron.

Las matrices biológicas pueden usarse para la secuenciación genética. En general, la secuenciación genética implica determinar el orden de los nucleótidos o ácidos nucleicos en una longitud de material genético, como un fragmento de ADN o ARN. Se están analizando secuencias cada vez más largas

de pares de bases, y la información de secuencia resultante se puede usar en varios métodos bioinformáticos para ajustar lógicamente los fragmentos juntos para determinar de manera confiable la secuencia de longitudes extensas de material genético del que se derivaron los fragmentos. Se han desarrollado exámenes computarizados, automatizados de fragmentos característicos y se han usado en el mapeo genómico, identificación de genes y su función, evaluación de riesgos de ciertas afecciones y estados de enfermedad, etc. Más allá de estas aplicaciones, las matrices biológicas pueden usarse para la detección y evaluación de una amplia gama de moléculas, familias de moléculas, niveles de expresión genética, polimorfismos de un solo nucleótido y genotipado.

## INTRODUCCIÓN

En un aspecto, una sustancia catalíticamente activa comprende una partícula mineral de sulfuro de cobre (I); y una molécula funcionalizada con alquino unida directamente a una superficie de la partícula mineral de sulfuro de cobre (I).

En un ejemplo de este aspecto, la partícula mineral de sulfuro de cobre (I) se selecciona entre el grupo que consiste en calcocita, djurleita, y digenita.

En un ejemplo de este aspecto, la molécula funcionalizada con alquino es un cebador que tiene un grupo funcional alquino, opcionalmente en el que el grupo funcional alquino está unido en el extremo 5' del cebador.

En un ejemplo de este aspecto, un enlace coordinado une la molécula funcionalizada con alquino a la superficie de la partícula mineral de sulfuro de cobre (I).

Debe entenderse que cualquier característica de este aspecto de la sustancia catalíticamente activa puede combinarse de cualquier manera y/o

configuración deseable.

En otro aspecto, un método comprende hacer reaccionar un mineral de sulfuro de cobre (I) con una molécula funcionalizada con alquino para formar una sustancia catalíticamente activa; y hacer reaccionar la sustancia catalíticamente activa con una molécula funcionalizada con azida para acoplar la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida. En otro aspecto, un método para hacer un triazol comprende hacer reaccionar una molécula funcionalizada con alquino con una molécula funcionalizada con azida en presencia de un mineral de sulfuro de cobre (I).

En un ejemplo de este aspecto, el método comprende además filtrar mineral de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar de la sustancia catalíticamente activa antes de hacer reaccionar la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida.

En un ejemplo de este aspecto, antes de hacer reaccionar el mineral de sulfuro de cobre (I) con la molécula funcionalizada con alquino, el método comprende además añadir un exceso estequiométrico del mineral de sulfuro de cobre (I), con respecto a la molécula funcionalizada con alquino, a la molécula funcionalizada con alquino.

En un ejemplo de este aspecto, el sulfuro de cobre (I) tiene un tamaño de partícula promedio que varía de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 45  $\mu\text{m}$ .

En un ejemplo de este aspecto, la reacción del mineral de sulfuro de cobre (I) con la molécula funcionalizada con alquino implica formar una mezcla del mineral de sulfuro de cobre (I), la molécula funcionalizada con alquino, y un disolvente de la molécula funcionalizada con alquino; y mantener la mezcla a una

temperatura que está por encima del punto de congelación del disolvente y por debajo del punto de ebullición del disolvente durante un tiempo de hasta aproximadamente 50 días. En este ejemplo, el disolvente se selecciona entre el grupo que consiste en agua, un tampón de carbonato sódico, un tampón de fosfato potásico y dimetilsulfóxido; y un pH de la mezcla varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 12. También en este ejemplo, el mantenimiento implica calentar la mezcla a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 60 °C durante un tiempo que varía de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos.

10            En un ejemplo de este aspecto, antes de hacer reaccionar la molécula funcionalizada con alquino o la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida, el método comprende además formar una capa de la molécula funcionalizada con azida en una superficie de un sustrato de celda de flujo, y en donde la molécula funcionalizada con alquino o la sustancia catalíticamente activa se hace reaccionar con la capa de la molécula funcionalizada con azida en la superficie del sustrato de la celda de flujo. En este ejemplo, la molécula funcionalizada con alquino o la sustancia catalíticamente activa está presente en una mezcla líquida, y en donde la mezcla líquida fluye sobre la capa de la molécula funcionalizada con azida en la superficie del sustrato de la celda de flujo. También en este ejemplo, antes de formar la capa, el método puede comprender además unir un silano o un derivado de silano a la superficie del sustrato para formar una superficie silanizada.

              En un ejemplo de este aspecto, el método se realiza sin coordinación de ligando y sin exposición a un agente reductor.

25            Debe entenderse que cualquier característica de este aspecto del método

puede combinarse de cualquier manera deseable. Además, debe entenderse que cualquier combinación de características de este aspecto del método y/o del aspecto de la sustancia catalíticamente activa puede usarse conjuntamente, y/o cualquier característica de uno o ambos de estos aspectos puede combinarse con cualquier de los ejemplos desvelados en el presente documento.

En otro aspecto más, una mezcla de injerto, comprende un cebador que incluye un grupo funcional alquino; un disolvente; y un mineral de sulfuro de cobre (I).

En un ejemplo de este aspecto, el grupo funcional alquino reacciona con una superficie del mineral de sulfuro de cobre (I) para formar una sustancia catalíticamente activa en la mezcla de injerto.

En un ejemplo de este aspecto, la mezcla de injerto comprende además una molécula funcionalizada con azida, en donde la molécula funcionalizada con azida debe reaccionar con la molécula funcionalizada con alquino, mediado por el mineral de sulfuro de cobre (I). En un ejemplo, la molécula funcionalizada con azida es un polímero. En un ejemplo, el polímero está en una superficie de un sustrato, opcionalmente en donde el sustrato es una celda de flujo.

En un ejemplo de este aspecto, la mezcla de injerto incluye un exceso estequiométrico del mineral de sulfuro de cobre (I) con respecto a la imprimación.

En un ejemplo de este aspecto, la mezcla de injerto incluye de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  del cebador; y de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 3 M del mineral de sulfuro de cobre (I).

En un ejemplo de este aspecto, el mineral de sulfuro de cobre (I) se selecciona entre el grupo que consiste en calcocita, djurleita y digenita, y tiene

un tamaño medio de partícula que varía de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 45  $\mu\text{m}$ .

Debe entenderse que cualquier característica de este aspecto de la mezcla de injerto se puede combinar de cualquier manera deseable. Además,  
5 debe entenderse que cualquier combinación de características de la mezcla de injerto y/o del método y/o de la sustancia catalíticamente activa puede usarse conjuntamente, y/o cualquier característica de cualquiera o de todos estos aspectos puede combinarse con cualquiera de las características de los ejemplos desvelados en el presente documento.

10 En un aspecto adicional más, Un método para injertar un cebador en una superficie de celda de flujo comprende hacer reaccionar un cebador funcionalizado con alquino en presencia de un mineral de sulfuro de cobre (I) con una molécula funcionalizada con azida en la superficie de la celda de flujo.

En un ejemplo de este aspecto adicional, el mineral de sulfuro de cobre (I)  
15 reacciona con el cebador funcionalizado con alquino para formar una sustancia catalíticamente activa, y la sustancia catalíticamente activa reacciona con la molécula funcionalizada con azida para acoplar la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida en la superficie de la celda de flujo. En algunos ejemplos, antes de hacer reaccionar el mineral de sulfuro de  
20 cobre (I) con el cebador funcionalizado con alquino, el método comprende además añadir un exceso estequiométrico del mineral de sulfuro de cobre (I), con respecto al cebador funcionalizado con alquino, al cebador funcionalizado con alquino. En algunos ejemplos, la reacción del mineral de sulfuro de cobre (I) con el cebador funcionalizado con alquino implica formar una mezcla del mineral  
25 de sulfuro de cobre (I), el cebador funcionalizado con alquino y un disolvente del

cebador funcionalizado con alquino, y manteniendo la mezcla a una temperatura que está por encima del punto de congelación del disolvente y por debajo del punto de ebullición del disolvente durante un tiempo de hasta aproximadamente 50 días. En algunos de estos ejemplos, el disolvente se selecciona entre el grupo  
5 que consiste en agua, un tampón de carbonato sódico, un tampón de fosfato potásico y dimetilsulfóxido, y un pH de la mezcla varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 12. También en algunos de estos ejemplos, el mantenimiento implica calentar la mezcla a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 60 °C durante un tiempo que varía de aproximadamente  
10 30 minutos a aproximadamente 90 minutos.

En un ejemplo de este aspecto adicional, antes de hacer reaccionar la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida en la superficie de la celda de flujo, el método comprende además formar una capa de la molécula funcionalizada con azida en la superficie de la celda de flujo, y en  
15 donde la sustancia catalíticamente activa reacciona con la capa de la molécula funcionalizada con azida en la superficie de la celda de flujo. En este ejemplo, la sustancia catalíticamente activa está presente en una mezcla líquida, y la mezcla líquida fluye sobre la capa de la molécula funcionalizada con azida en la superficie de la celda de flujo. En algunos de estos ejemplos, antes de formar la  
20 capa, el método comprende además unir un silano o un derivado de silano a la superficie de la celda de flujo para formar una superficie silanizada. También en algunos de estos ejemplos, la capa de la molécula funcionalizada con azida es poli(N- (5-azidoacetamidilpentil) acrilamida-co-acrilamida).

Un ejemplo de este aspecto adicional comprende además filtrar mineral  
25 de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar de la sustancia catalíticamente activa antes

de hacer reaccionar la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida en la superficie de la celda de flujo.

Debe entenderse que cualquier característica de este aspecto del método puede combinarse de cualquier manera deseable. Además, debe entenderse que cualquier combinación de características de este método y/o la mezcla de injerto y/o el otro método y/o de la sustancia catalíticamente activa pueden usarse juntas, y/o cualquier característica de cualquiera o todos estos aspectos pueden combinarse con cualquiera de las características de los ejemplos desvelados en el presente documento.

## 10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características de los ejemplos de la presente divulgación serán evidentes por referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos, en los que los números de referencia similares corresponden a componentes similares, aunque quizá no idénticos. Por razones de brevedad, los números de referencia o las características que tienen una función descrita previamente pueden o no describirse en relación con otros dibujos en los que aparecen.

La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra un ejemplo de un método dado a conocer en el presente documento;

las Figs. 2A a 2E son vistas esquemáticas en sección transversal que representan un ejemplo de adición de química de superficie a un sustrato estampado usando un primer ejemplo de una mezcla de injerto, y las Figs. 2A, 2B y 2E son vistas esquemáticas en sección transversal que representan un ejemplo de adición de química de superficie a un sustrato estampado usando un segundo ejemplo de una mezcla de injerto;

las Figs. 3 A a 3D son vistas esquemáticas en sección transversal que

representan un ejemplo de adición de química de superficie a un sustrato sin patrón usando un primer ejemplo de una mezcla de injerto, y las Figs. 3 A, 3B y 3D son vistas esquemáticas en sección transversal que representan un ejemplo de adición de química de superficie a un sustrato sin patrón usando un segundo ejemplo de una mezcla de injerto;

la figura 4 es un gráfico de la intensidad de fluorescencia (unidades de intensidad relativa, RFU) después de un ensayo de accesibilidad del cebador de superficie (ensayo CFR) para una celda de flujo de ejemplo y celdas de flujo comparativas;

la figura 5 es un gráfico de la intensidad de fluorescencia (unidades de intensidad relativa, RFU) después de un ensayo de accesibilidad del cebador de superficie (ensayo CFR) para diferentes células de flujo de ejemplo formadas a partir de sustancias catalíticamente activas que se incubaron durante diferentes periodos de tiempo; y

las Figs. 6A a 6C son gráficos que representan resultados dinámicos de dispersión de luz para diferentes mezclas, cuyos resultados ilustran que la mezcla de injerto desvelada en el presente documento forma sustancias catalíticamente activas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los ejemplos del método divulgado en el presente documento implican la formación de una sustancia catalíticamente activa que contiene cobre (Cu) en su estado de oxidación +1. Los minerales de sulfuro de cobre (I) son monosulfuros de cobre, donde  $1,6 \leq \text{Cu/S} \leq 2$ . Ejemplos de minerales de sulfuro de cobre (I) son calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) o djurleita ( $\text{Cu}_{31}\text{S}_{16}$ ) o digenita ( $\text{Cu}_9\text{S}_5$ ). En algunos aspectos, una sustancia catalíticamente activa se forma usando un sulfuro de

cobre (I) mineral, que funciona como la fuente de las especies de cobre activas ( $\text{Cu}^+$ ). En los ejemplos desvelados en el presente documento, el mineral de sulfuro de cobre (I) se hace reaccionar con una molécula funcionalizada con alquino y una molécula funcionalizada con azida para formar un triazol. En algunos aspectos, el sulfuro de cobre (I) reacciona con una molécula funcionalizada con alquino para formar la sustancia catalíticamente activa, que incluye la partícula mineral de sulfuro de cobre (I) y la molécula funcionalizada con alquino directamente unida a la superficie de la partícula de sulfuro de cobre (I) mineral. Se ha encontrado que esta reacción se puede realizar sin coordinar una especie de  $\text{Cu}^{2+}$  a un ligando estabilizador (por ejemplo, para evitar la precipitación) y sin exponer la especie de  $\text{Cu}^{2+}$  estabilizada a un agente reductor (por ejemplo, ascorbato) para generar las especies de cobre catalíticamente activas. Evitar el uso de reactivos adicionales para la coordinación de ligandos y la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  es deseable ya que estos reactivos adicionales pueden aumentar la complejidad y el coste de la reacción, puede provocar reacciones secundarias indeseables y puede implicar reactivos tóxicos o indeseables. Sin coordinación y reducción de ligandos, el método de ejemplo desvelado(s) en el presente documento es un proceso simplificado que no implica reactivos adicionales además del sulfuro mineral de cobre (I) y la molécula funcionalizada con alquino.

Además, se ha encontrado que la reacción heterogénea de la molécula funcionalizada con alquino en la superficie del mineral de sulfuro de cobre (I) ocurre en ausencia de luz (es decir, no es impulsada por la luz), que es diferente a los puntos cuánticos de  $\text{Cu}_2\text{S}$  estabilizados por polímero.

Aún más, en algunos ejemplos del método desvelado en el presente

documento, la molécula funcionalizada con alquino es un cebador que incluye un grupo funcional alquino. En estos ejemplos, la sustancia catalíticamente activa puede usarse en una reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (I) para acoplar el grupo funcional alquino del cebador a una molécula funcionalizada con azida. Esta reacción de cicloadición puede tener lugar en presencia de un medio acuoso y en presencia de oxígeno sin desproporcionar las especies de cobre activas a  $\text{Cu}^0$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , en parte porque la especie activa de cobre está coordinada con el cebador y el azufre en la sustancia catalíticamente activa.

La eliminación del catalizador de cobre ha demostrado ser difícil en otras reacciones de cicloadición de azida-alquino, en parte debido a la tendencia de las especies de cobre activas desproporcionadas a  $\text{Cu}^0$  y  $\text{Cu}^{2+}$ . Las técnicas de eliminación que a menudo se usan incluyen técnicas de intercambio iónico o de extracción líquido-líquido. Otras técnicas para facilitar la eliminación del catalizador de cobre han incluido la incorporación de una etiqueta fluorada al catalizador, donde la etiqueta fluorada facilita la eliminación del catalizador marcado mediante técnicas de extracción en fase sólida. A diferencia de estas técnicas, que implican herramientas sofisticadas y/o materiales adicionales para facilitar la eliminación del catalizador de cobre, algunos ejemplos del método desvelados en el presente documento implican métodos simples, tales como centrifugación o filtración, para eliminar el sulfuro de cobre (I) mineral sin reaccionar. Se pueden usar estas técnicas simples, porque, en algunos ejemplos, una sola mezcla de injerto (denominada en el presente documento segundo ejemplo de la mezcla de injerto) incluye un producto de reacción azida-alquino disuelto y no disuelto, mineral de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar, el

último de los cuales se puede separar por centrifugación o filtración.

Debe entenderse que los términos usados en el presente documento tendrán su significado habitual en la técnica relevante a menos que se especifique lo contrario. Varios términos usados en el presente documento y sus  
5 significados se exponen a continuación.

Las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos que comprenden, incluyendo, que contiene y diversas formas de estos términos son sinónimos entre sí y están destinados a ser  
10 igualmente amplios.

Los términos arriba, abajo, menor, superiores, sobre, etc. se usan en el presente documento para describir la celda de flujo y/o los diversos componentes de la celda de flujo. Debe entenderse que estos términos direccionales no están destinados a implicar una orientación específica, pero se usan para designar  
15 orientación relativa entre componentes. El uso de términos direccionales no debe interpretarse para limitar los ejemplos desvelados en el presente documento a ninguna orientación específica.

Como se usa en el presente documento, "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que está completamente saturada (es decir, no contiene enlaces dobles o triples). El grupo alquilo puede tener de 1 a 20  
20 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo, y similares. Como ejemplo, la designación "alquilo C1-4" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena alquilo, es decir, la cadena de alquilo se selecciona entre  
25 el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, iso-propilo, n-butilo, isobutilo, sec-

butilo y t-butilo.

Como se usa en el presente documento, "alquenilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que contiene uno o más dobles enlaces. El grupo alquenilo puede tener de 2 a 20 átomos de carbono. Los  
5 ejemplos de grupos alquenilo incluyen etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, y similares.

Como se usa en el presente documento, "alquino" o "alquinilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que contiene uno o más enlaces triples. El grupo alquinilo puede tener de 2 a 20 átomos de carbono. Una  
10 molécula funcionalizada con alquino es cualquier molécula que incluye un grupo funcional alquino.

Como se usa en el presente documento, "arilo" se refiere a un anillo o sistema anular aromático (es decir, dos o más anillos fusionados que comparten dos átomos de carbono adyacentes) que contiene solo carbono en la cadena  
15 principal del anillo. Cuando el arilo es un sistema anular, cada anillo en el sistema es aromático. El grupo arilo puede tener de 6 a 18 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, azulenilo y antracenilo.

Como se usa en el presente documento, el término "unido" se refiere al estado de dos cosas que se unen, pegan, adherirse, conectan o se unen entre  
20 sí. Por ejemplo, un ácido nucleico se puede unir a un polímero mediante un enlace covalente o no covalente. Un enlace covalente se caracteriza por compartir pares de electrones entre átomos. En un ejemplo, el enlace covalente puede ser un enlace de coordinación entre el sulfuro de cobre (I) y la molécula funcionalizada con alquino. Un enlace no covalente es un enlace físico que no  
25 implica el intercambio de pares de electrones y puede incluir, por ejemplo,

enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófilas e interacciones hidrófobas.

Un grupo funcional "azida" o "azido" se refiere a  $-N_3$ . Una molécula funcionalizada con azida es cualquier molécula que incluye un grupo funcional  
5 azida.

Como se usa en el presente documento, la "región de unión" se refiere a un área en un sustrato o soporte que se va a unir a otro material, que puede ser, como ejemplos, una capa espaciadora, una pestaña, otro sustrato, etc., o combinaciones de los mismos (por ejemplo, una capa espaciadora y una  
10 pestaña). El enlace que se forma en la región de enlace puede ser un enlace químico (como se describió anteriormente) o un enlace mecánico (por ejemplo, usando un cierre, etc.).

Como se usa en el presente documento, "carbociclilo" significa un anillo cíclico no aromático o sistema anular que contiene solo átomos de carbono en  
15 la cadena principal del sistema anular. Cuando el carbociclilo es un sistema anular, dos o más anillos se pueden unir de una manera fusionada, por puentes o conectados por espiro. Los carbociclicos pueden tener cualquier grado de saturación, siempre que al menos un anillo en un sistema anular no sea aromático. Por lo tanto, los carbociclicos incluyen cicloalquilos, cicloalquenos, y  
20 cicloalquinos. El grupo carbociclilo puede tener de 3 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos de anillos de carbociclilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 2,3-dihidro-indeno, biciclo[2.2.2]octanilo, adamantilo, y espiro[4,4]nonanilo.

Como se usa en el presente documento, "cicloalquileno" significa un anillo  
25 de carbociclilo completamente saturado o un sistema anular que está unido al

resto de la molécula mediante dos puntos de unión.

Como se usa en el presente documento, "cicloalquenilo" o "cicloalqueno" significa un anillo de carbociclilo o sistema anular que tiene al menos un doble enlace, en donde ningún anillo en el sistema anular es aromático. Los ejemplos  
5 incluyen ciclohexenilo o ciclohexeno y norbornenilo o norborneno. Además, como se usa en el presente documento, "heterocicloalquenilo" o "heterocicloalqueno" significa un anillo de carbociclilo o sistema anular con al menos un heteroátomo en la estructura del anillo, que tiene al menos un doble enlace, en donde ningún anillo en el sistema anular es aromático.

10 Como se usa en el presente documento, "cicloalquinilo" o "cicloalquineno" significa un anillo de carbociclilo o sistema anular que tiene al menos un triple enlace, en donde ningún anillo en el sistema anular es aromático. Un ejemplo es ciclooctino. Otro ejemplo es biclilononino. Además, como se usa en el presente documento, "heterocicloalquinilo" o "heterocicloalquino" significa un anillo de  
15 carbociclilo o sistema anular con al menos un heteroátomo en la estructura del anillo, que tiene al menos un triple enlace, en donde ningún anillo en el sistema anular es aromático.

El término "deposición", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier técnica de aplicación adecuada, que puede ser manual o  
20 automatizada, y da como resultado la modificación de las propiedades de la superficie. En general, la deposición puede realizarse usando técnicas de deposición de vapor, técnicas de revestimiento, técnicas de injerto, o similares. Algunos ejemplos específicos incluyen deposición química de vapor (CVD), revestimiento por pulverización (por ejemplo, revestimiento por pulverización  
25 ultrasónica), revestimiento por centrifugado, revestimiento por remojo o

inmersión, revestimiento con racleta, dispensación en pocillos, revestimiento por flujo continuo, impresión por aerosol, impresión por chorro de tinta, o similares.

Como se usa en el presente documento, el término "depresión" se refiere a una característica cóncava discreta en un sustrato estampado que tiene una  
5 abertura en la superficie que está completamente rodeada por regiones intersticiales de la superficie del sustrato estampado. Las depresiones pueden tener cualquiera de una variedad de formas en su apertura en una superficie que incluye, como ejemplos, redonda, elíptica, cuadrada, poligonal, forma de estrella (con cualquier número de vértices), etc. La sección transversal de una depresión  
10 tomada ortogonalmente con la superficie puede ser curva, cuadrada, poligonal, hiperbólica, cónica, angular, etc. Como ejemplo, La depresión puede ser un pocillo. Además, como se usa en el presente documento, una "depresión funcionalizada" se refiere a la característica cóncava discreta donde se unen el polímero y los cebadores.

15 El término "cada uno", cuando se usa en referencia a una colección de artículos, está destinado a identificar un artículo individual en la colección, pero no necesariamente se refiere a cada elemento de la colección. Pueden ocurrir excepciones si la divulgación explícita o el contexto dictan claramente lo contrario.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "celda de flujo" significa un recipiente que tiene una cámara (es decir, un canal de flujo) donde se puede realizar una reacción, una entrada para suministrar reactivo(s) a la cámara y una salida para extraer reactivo(s) de la cámara. En algunos ejemplos, la cámara permite la detección de la reacción que ocurre en la cámara. Por  
25 ejemplo, la cámara puede incluir una o más superficies transparentes que

permiten la detección óptica de matrices, moléculas marcadas ópticamente, o similares, en la cámara.

Como se usa en el presente documento, un "canal de flujo" puede ser un área definida entre dos componentes unidos, que puede recibir selectivamente una muestra líquida. En algunos ejemplos, el canal de flujo puede definirse entre un sustrato estampado y una pestaña, y por lo tanto puede estar en comunicación fluida con una o más depresiones definidas en el sustrato estampado. En otros ejemplos, el canal de flujo puede definirse entre un sustrato sin diseño y una pestaña.

El término "capa funcionalizada" se refiere a una capa que incluye la molécula funcionalizada con azida que tiene la molécula funcionalizada con alquino acoplada a la misma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "mezcla de injerto" se refiere a una mezcla o solución que incluye componentes químicos de superficie. Un primer ejemplo de la mezcla de injerto desvelada en el presente documento incluye el sulfuro de cobre (I) y la molécula funcionalizada con alquino y/o un producto de reacción del sulfuro de cobre (I) y la molécula funcionalizada con alquino (a la que se hace referencia en el presente documento como la sustancia catalíticamente activa). Este primer ejemplo de la mezcla de injerto también puede incluir un disolvente. Además como se describe en el presente documento, el primer ejemplo de la mezcla de injerto puede usarse para introducir la molécula funcionalizada con alquino en una capa ya formada de la molécula funcionalizada con azida. Un segundo ejemplo de la mezcla de injerto desvelada en el presente documento incluye el sulfuro de cobre (I), la molécula funcionalizada con alquino, y la molécula funcionalizada con azida, y/o la

sustancia catalíticamente activa, y/o un producto de reacción de la sustancia catalíticamente activa y la molécula funcionalizada con azida. Este segundo ejemplo de la mezcla de injerto también puede incluir un disolvente. Además como se describe en el presente documento, el segundo ejemplo de la mezcla de injerto puede usarse para introducir una capa funcionalizada en un sustrato de celda de flujo.

Como se usa en el presente documento, "heteroarilo" se refiere a un anillo o sistema anular aromático (es decir, dos o más anillos fusionados que comparten dos átomos adyacentes) que contienen uno o más heteroátomos, es decir, un elemento distinto de carbono, incluyendo, pero sin limitación, nitrógeno, oxígeno y azufre, en la cadena principal del anillo. Cuando el heteroarilo es un sistema anular, cada anillo en el sistema es aromático. El grupo heteroarilo puede tener 5-18 miembros del anillo.

Como se usa en el presente documento, "heterociclilo" significa un anillo cíclico no aromático o sistema anular que contiene al menos un heteroátomo en la cadena principal del anillo. Los heterociclilos se pueden unir de una manera fusionada, por puentes o conectados por espiro. Los heterociclilos pueden tener cualquier grado de saturación, con la condición de que al menos un anillo en el sistema anular no sea aromático. En el sistema anular, el heteroátomo(s) puede estar presente en un anillo no aromático o aromático. El grupo heterociclilo puede tener de 3 a 20 miembros del anillo (es decir, el número de átomos que forman la estructura del anillo, incluyendo átomos de carbono y heteroátomos). En algunos ejemplos, los heteroátomos son O, N, o S.

Como se usa en el presente documento, "hidroxi" o "hidroxilo" se refiere a un grupo -OH.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región intersticial" se refiere a un área en un sustrato o en una superficie que separa las depresiones. Por ejemplo, una región intersticial puede separar una característica de una matriz de otra característica de la matriz. Las dos

5 características que están separadas entre sí pueden ser discretas, es decir, careciendo de contacto físico entre ellas. En otro ejemplo, una región intersticial puede separar una primera parte de una característica de una segunda parte de una característica. En muchos ejemplos, la región intersticial es continua mientras que las características son discretas, por ejemplo, como es el caso de

10 una pluralidad de pocillos definidos en una superficie de otra manera continua. La separación proporcionada por una región intersticial puede ser una separación parcial o total. Las regiones intersticiales pueden tener un material de superficie que difiere del material de superficie de las características definidas en la superficie. Por ejemplo, Las características de una matriz pueden tener una

15 cantidad o concentración de la capa de revestimiento y la imprimación que excede la cantidad o concentración presente en las regiones intersticiales. En algunos ejemplos, la capa de revestimiento y la imprimación(imprimaciones) pueden no estar presentes en las regiones intersticiales.

Como se usa en el presente documento, un "nucleótido" incluye una base

20 heterocíclica que contiene nitrógeno, un azúcar, y uno o más grupos fosfato. Los nucleótidos son unidades monoméricas de una secuencia de ácidos nucleicos. En el ARN, el azúcar es una ribosa, y en el ADN, el azúcar es una desoxirribosa, es decir, un azúcar que carece de un grupo hidroxilo que está presente en la posición 2' en la ribosa. La base heterocíclica que contiene nitrógeno (es decir,

25 nucleobase) puede ser una base de purina o una base de pirimidina. Las bases

de purina incluyen adenina (A) y guanina (G), y derivados modificados o análogos de las mismas. Las bases de pirimidina incluyen citosina (C), timina (T), y uracilo (U), y derivados modificados o análogos de las mismas. El átomo C-1 de desoxirribosa está unido a N-1 de una pirimidina o N-9 de una purina.

5 El término "sustrato de celda de flujo" o "sustrato" se refiere a un soporte sobre el cual se puede añadir la química de la superficie. La expresión "sustrato estampado" se refiere a un soporte en el cual o sobre el cual se definen las depresiones. La expresión "sustrato sin diseño" se refiere a un soporte sustancialmente plano. El sustrato puede ser una oblea, un panel, una hoja  
10 rectangular, un troquel, o cualquier otra configuración adecuada. El sustrato es generalmente rígido e insoluble en un líquido acuoso. El sustrato puede ser inerte a una química que se usa para modificar las depresiones. Por ejemplo, un sustrato puede ser inerte a la química usada para formar la capa de polímero, para unir las imprimaciones a la capa de polímero, etc. Los ejemplos de sustratos  
15 adecuados incluyen epoxi siloxano, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluidos acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, politetrafluoroetileno (como TEFLON® de Chemours), olefinas cíclicas/polímeros de cicloolefina (COP) (como ZEONOR® de Zeon), poliimidas, etc.), nailon,  
20 cerámica/óxidos cerámicos, sílice, sílice fundida, o materiales a base de sílice, silicato de aluminio, silicio y silicio modificado (por ejemplo, boro dopado p+ silicio), nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ), pentóxido de tántalo ( $\text{TaO}_5$ ) u otro(s) óxido(s) de tántalo ( $\text{TaO}_x$ ), óxido de hafnio ( $\text{HfO}_2$ ), carbono, metales, vidrios inorgánicos, o similares. El sustrato también puede ser vidrio o  
25 silicio, con una capa de revestimiento de óxido de tántalo u otro óxido cerámico

en la superficie.

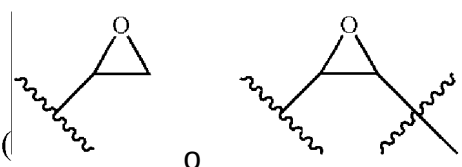
Como se usa en el presente documento, "cenizas de plasma" se refiere a un proceso de eliminación de materia orgánica de un sustrato mediante un plasma de oxígeno. Los productos que resultan de la ceniza de plasma pueden eliminarse con una bomba/sistema de vacío. La ceniza de plasma puede activar el sustrato mediante la introducción de grupos hidroxilo reactivos.

La "capa de polímero" a la que se hace referencia en el presente documento pretende significar un material semirrígido que es permeable a líquidos y gases. La capa de polímero puede ser un hidrogel que puede hincharse cuando absorbe líquido y que puede contraerse cuando el líquido se elimina por secado. En los ejemplos desvelados en el presente documento, la capa de polímero puede incluir la molécula funcionalizada con azida que puede reaccionar con un grupo funcional alquino. En un ejemplo, la molécula funcionalizada con azida y la capa de polímero es poli(N- (5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida) (PAZAM).

Como se usa en el presente documento, el "cebador" se define como una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla (por ejemplo, ADN de cadena sencilla o ARN de cadena sencilla) que sirve como punto de partida para la síntesis de ADN o ARN. El extremo 5' del cebador puede modificarse para permitir una reacción de acoplamiento con la molécula funcionalizada con azida. La longitud del cebador puede ser de cualquier número de bases y puede incluir una variedad de nucleótidos no naturales. En un ejemplo, el cebador de secuenciación es una hebra corta, que varía de 20 a 40 bases.

Como se usa en el presente documento, los términos "silano" y "derivado de silano" se refieren a un compuesto orgánico o inorgánico que contiene uno o

más átomos de silicio. Un ejemplo de un compuesto de silano inorgánico es  $\text{SiH}_4$ , o  $\text{SiH}_4$ halogenado donde el hidrógeno se reemplaza por uno o más átomos de halógeno. Un ejemplo de un compuesto de silano orgánico es  $\text{X-R}^{\text{B}}\text{-Si(OR}^{\text{C}}\text{)}_3$ , en donde X es un grupo orgánico no hidrolizable, tales como grupos amino,

- 5 vinilo, metacrilato, epoxi , azufre, alquilo, alquenilo, o alquinilo;  $\text{R}^{\text{B}}$  es un espaciador, por ejemplo  $-(\text{CH}_2)_n-$ , en donde n es de 0 a 1000;  $\text{R}^{\text{C}}$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo
- 10 de 5-10 miembros opcionalmente sustituido y heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido, como se define en el presente documento. Como se usa en el presente documento, los términos "silano" y "derivado de silano" pueden incluir mezclas de diferentes compuestos de silano y/o derivados de silano.
- 15 En algunos ejemplos, el silano o derivado de silano incluye un resto insaturado que es capaz de reaccionar con un grupo funcional de la molécula funcionalizada con azida. Como se usa en el presente documento, la expresión "resto insaturado" se refiere a un grupo químico que incluye cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes
- 20 opcionalmente sustituidas de los mismos que incluyen al menos un doble enlace o un triple enlace. Los restos insaturados pueden ser monovalentes o divalentes. Cuando el resto insaturado es monovalente, cicloalqueno, cicloalquino, heterocicloalqueno, y heterocicloalquino se usan indistintamente con

cicloalquenilos, cicloalquinilos, heterocicloalqueno, y heterocicloalquino, respectivamente. Cuando el resto insaturado es divalente, cicloalqueno, cicloalquino, heterocicloalqueno, y heterocicloalquino se usan indistintamente con cicloalquenileno, cicloalquinileno, heterocicloalquenileno, y  
5 heterocicloalquinileno, respectivamente.

El resto insaturado puede estar unido covalentemente, directamente a los átomos de silicio del silano o derivado de silano, o indirectamente unido mediante conectores. Los ejemplos de conectores adecuados incluyen alquilenos opcionalmente sustituidos (es decir, radicales alifáticos saturados divalentes  
10 (como etileno) considerados como derivados de un alqueno al abrir el doble enlace o de un alcano por eliminación de dos átomos de hidrógeno de diferentes átomos de carbono), polietilenglicoles sustituidos, o similares.

Una "capa espaciadora", como se usa en el presente documento se refiere a un material que une dos componentes entre sí. En algunos ejemplos, la capa  
15 espaciadora puede ser un material absorbente de radiación que ayuda a la unión, o puede ponerse en contacto con un material absorbente de radiación que ayuda a la unión.

El término "química de superficie", como se usa en el presente documento se refiere a componentes químicamente y/o biológicamente activos que se incorporan a la cámara de la celda de flujo. Los ejemplos de la química superficial  
20 desvelada en el presente documento incluyen el cebador, que puede ser parte de la sustancia catalíticamente activa y que puede estar unida a la molécula funcionalizada con azida. Por tanto, con ejemplo de la química de la superficie es la capa funcionalizada.

25 Un ejemplo del método 100 se representa en la Fig. 1. El método 100

incluye hacer reaccionar un mineral de sulfuro de cobre (I) con una molécula funcionalizada con alquino para formar una sustancia catalíticamente activa (como se muestra en el número de referencia 102), y hacer reaccionar la sustancia catalíticamente activa con una molécula funcionalizada con azida para  
5 acoplar la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida (como se muestra en el número de referencia 104).

Como se mencionó anteriormente, el mineral de sulfuro de cobre (I) puede ser cualquier mineral de sulfuro de cobre (I), como calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) o djurleita ( $\text{Cu}_{31}\text{S}_{16}$ ) o digenita ( $\text{Cu}_9\text{S}_5$ ). La forma mineral es la forma natural del mineral de  
10 sulfuro de cobre (I). Por tanto, el mineral de sulfuro de cobre (I) no se estabiliza con un polímero de superficie u otro compuesto estabilizador, no se expone a tratamientos superficiales, etc. El mineral de sulfuro de cobre (I) puede tener cualquier tamaño de partícula adecuado. En un ejemplo, el mineral de sulfuro de cobre (I) tiene un tamaño de partícula promedio menor o igual a  $45\text{ }\mu\text{m}$ . En otro  
15 ejemplo, el mineral de sulfuro de cobre (I) tiene un tamaño de partícula promedio que varía de aproximadamente  $500\text{ nm}$  a aproximadamente  $45\text{ }\mu\text{m}$ . En otro ejemplo más, el mineral de sulfuro de cobre (I) tiene un tamaño de partícula promedio que varía de aproximadamente  $1\text{ }\mu\text{m}$  a aproximadamente  $40\text{ }\mu\text{m}$ . Aunque se han proporcionado varios ejemplos, el tamaño medio de partícula del  
20 mineral de sulfuro de cobre (I) puede ser mayor o menor.

Se puede usar cualquier molécula funcionalizada con alquino en los ejemplos desvelados en el presente documento. En un ejemplo, la molécula funcionalizada con alquino es un cebador, como un cebador de secuenciación, que incluye un grupo funcional alquino. El cebador puede ser cualquier cebador  
25 de amplificación directa o cebador de amplificación inversa que incluya el grupo

funcional alquino. Ejemplos específicos de cebadores adecuados incluyen  
cebadores P5 y/o P7, que se usan en la superficie de celdas de flujo comerciales  
comercializadas por Illumina Inc. para secuenciar en HISEQ™, HISEQX™,  
MISEQ™, MISEQX™, NEXTSEQ™, NOVASeq™, GENOME ANALYZER™, y  
5 otras plataformas instrumentales.

Para formar la sustancia catalíticamente activa, el mineral de sulfuro de  
cobre (I) y la molécula funcionalizada con alquino se combinan y se incuban  
durante un periodo de tiempo, permitiendo que los componentes reaccionen. Los  
componentes pueden combinarse en cualquier disolvente en el que la molécula  
10 funcionalizada con alquino sea soluble. En algunos ejemplos, también puede ser  
deseable seleccionar un disolvente que pueda disolver la molécula  
funcionalizada con azida, ya que la reacción de la sustancia catalíticamente  
activa con la molécula funcionalizada con azida también puede producirse en el  
disolvente. En un ejemplo, el disolvente es un disolvente polar. Los ejemplos de  
15 disolventes polares adecuados se seleccionan entre el grupo que consiste en  
agua, un carbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ), un tampón, un tampón de fosfato potásico  
( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetona,  
acetonitrilo, butanol, propanol, etanol, metanol, y sus mezclas. Se cree que  
pueden usarse otros disolventes y, en algunos casos, la sustancia  
20 catalíticamente activa puede no ser soluble o puede ser parcialmente soluble en  
estos otros disolventes.

Un ejemplo de reacción del mineral de sulfuro de cobre (I) con la molécula  
funcionalizada con alquino incluye formar una mezcla (es decir, el primer ejemplo  
de la mezcla de injerto) del mineral de sulfuro de cobre (I), la molécula  
25 funcionalizada con alquino, y el disolvente de la molécula funcionalizada con

alquino, y manteniendo el primer ejemplo de la mezcla de injerto a una temperatura que está por encima del punto de congelación del disolvente y por debajo del punto de ebullición del disolvente durante un tiempo de hasta aproximadamente 50 días. Aunque la reacción puede iniciarse instantáneamente con la combinación del mineral de sulfuro de cobre (I) y la molécula funcionalizada con alquino, el periodo de incubación puede prolongarse para garantizar que la reacción se complete.

El pH del primer ejemplo de la mezcla de injerto puede variar de aproximadamente 4 a aproximadamente 12, dependiendo, en parte, del disolvente usado y si el disolvente estará presente durante la reacción posterior de la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida. Para disolventes acuosos, se puede usar un tampón adecuado o un ácido fuerte para ajustar el pH.

En un ejemplo para formar el primer ejemplo de la mezcla de injerto, la molécula funcionalizada con alquino puede añadirse al disolvente para formar una solución, y luego el mineral de sulfuro de cobre (I) puede añadirse a la solución. En otro ejemplo para formar el primer ejemplo de la mezcla de injerto, la molécula funcionalizada con alquino y el mineral de sulfuro de cobre (I) se pueden añadir al disolvente. En otro ejemplo más para formar el primer ejemplo de la mezcla de injerto, la solución se puede añadir al mineral de sulfuro de cobre (I). Por ejemplo, el mineral de sulfuro de cobre (I) puede empaquetarse en una columna, y la solución de la molécula funcionalizada con alquino en el disolvente puede fluir a través de la columna para generar la sustancia catalíticamente activa. En cualquiera de estos ejemplos, se puede añadir un exceso estequiométrico del mineral de sulfuro de cobre (I) (con respecto a la

concentración de la molécula funcionalizada con alquino en la solución). La cantidad de sulfuro de cobre (I) mineral usado también puede depender, en parte, del tamaño medio de partícula del mineral de sulfuro de cobre (I). Las partículas minerales de sulfuro de cobre (I) más pequeñas tienen una mayor  
5 relación de área superficial a volumen que las partículas minerales de sulfuro de cobre (I) más grandes y, por lo tanto, se pueden usar cantidades más pequeñas de las partículas minerales de sulfuro de cobre (I) más pequeñas en comparación con las cantidades de partículas minerales de sulfuro de cobre (I) más grandes que pueden usarse.

10 El primer ejemplo de la mezcla de injerto puede incluir de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  de la molécula funcionalizada con alquino y de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 3 M de las partículas minerales de sulfuro de cobre (I). Se puede usar cualquier concentración de la molécula funcionalizada con alquino, aunque el límite  
15 superior depende de la solubilidad de la molécula funcionalizada con alquino en el disolvente usado. Como se ha descrito anteriormente, se puede usar cualquier concentración del mineral de sulfuro de cobre (I), siempre que esté en exceso estequiométrico de la concentración de la molécula funcionalizada con alquino.

Como un ejemplo específico del primer ejemplo de la mezcla de injerto,  
20 los cebadores P5 y P7 (que tienen un grupo funcional alquino unido al mismo) y un exceso estequiométrico de partículas de  $\text{Cu}_2\text{S}$  se mezclan en tampón de carbonato sódico 0,5 M o 1 M a un pH de aproximadamente 10. Como otro ejemplo específico del primer ejemplo de la mezcla de injerto, los cebadores P5 y P7 (que tienen un grupo funcional alquino unido al mismo) y un exceso  
25 estequiométrico de partículas de  $\text{Cu}_2\text{S}$  se mezclan con agua desionizada o

dimetilsulfóxido. Como otro ejemplo específico del primer ejemplo de la mezcla de injerto, los cebadores P5 y P7 (que tienen un grupo funcional alquino unido al mismo) y un exceso estequiométrico de partículas de  $\text{Cu}_2\text{S}$  se mezclan en tampón fosfato potásico 50 mM a un pH de aproximadamente 8.

5 Por tanto, algunos ejemplos del primer ejemplo de la mezcla de injerto incluyen el cebador que incluye el grupo funcional alquino, el disolvente del cebador, y el mineral sulfuro de cobre (I). En algunos ejemplos, el primer ejemplo de la mezcla de injerto incluye un exceso estequiométrico del mineral de sulfuro de cobre (I) con respecto al cebador. En un ejemplo, el primer ejemplo de la  
10 mezcla de injerto incluye de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  del cebador, y de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 3 M del mineral de sulfuro de cobre (I). Dado que la reacción entre el grupo funcional alquino y el mineral de sulfuro de cobre (I) puede ocurrir sustancialmente de manera instantánea, el primer ejemplo de la mezcla de injerto puede incluir la sustancia  
15 catalíticamente activa además de cualquier cebador sin reaccionar (u otra molécula funcionalizada con alquino), cualquier mineral de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar, y el disolvente.

Una vez que se prepara la mezcla (primer ejemplo de la mezcla de injerto), el primer ejemplo de la mezcla de injerto se mantiene a una temperatura que  
20 está por encima del punto de congelación del disolvente y por debajo del punto de ebullición del disolvente durante un periodo de incubación de hasta aproximadamente 50 días. Por tanto, la temperatura a la que se mantiene la mezcla depende, en parte, del disolvente usado para la reacción. Se ha encontrado que la sustancia catalíticamente activa formada como resultado de  
25 la reacción es estable y todavía catalíticamente activa cuando se incuba durante

aproximadamente 50 días. Debe entenderse, sin embargo, que el periodo de incubación puede ser más largo si, al final del periodo, la sustancia catalíticamente activa permanece estable y catalíticamente activa. En algunos ejemplos, mantener el primer ejemplo de la mezcla de injerto implica permitir que la mezcla repose durante el periodo de incubación sin ningún calentamiento adicional. En otros ejemplos, antener el primer ejemplo de la mezcla de injerto implica calentar la mezcla a la temperatura deseada. Por ejemplo, mantener el primer ejemplo de la mezcla de injerto puede implicar calentar el primer ejemplo de la mezcla de injerto a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 60 °C durante un tiempo que varía de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos.

La reacción para formar la sustancia catalíticamente activa no es impulsada por la luz y, por lo tanto, puede realizarse en un recipiente u horno oscuro, o puede tener lugar a la luz ambiental. Para dirigir la reacción no se usa luz adicional.

El método puede implicar mezclar el mineral de sulfuro de cobre (I) y la molécula funcionalizada con alquino durante la reacción. Por ejemplo, el primer ejemplo de la mezcla de injerto se puede agitar esporádica o continuamente mientras se incuba. Como se menciona en el presente documento, el método también puede implicar hacer fluir la solución de la molécula funcionalizada con alquino a través de una columna del mineral de sulfuro de cobre (I).

En el primer ejemplo de la mezcla de injerto y durante el periodo de incubación, el sulfuro de cobre (I) reacciona con el grupo funcional alquino de la molécula funcionalizada con alquino para formar la sustancia catalíticamente activa. Más particularmente, el alquino de la molécula funcionalizada con alquino

puede sufrir una reacción heterogénea en la superficie del sulfuro de cobre (I). Por tanto, el alquino puede sufrir un cambio químico en una interfaz, por ejemplo, en la superficie del catalizador sólido de sulfuro de cobre (I). Por tanto, la molécula funcionalizada con alquino se une directamente a la superficie de la partícula mineral de sulfuro de cobre (I) sólido. La sustancia resultante puede estar en forma de grupos, que pueden ser solubles en el disolvente usado en la reacción. En estos grupos, la molécula funcionalizada con alquino puede coordinarse con el  $\text{Cu}^+$  en la superficie del sulfuro de cobre (I) sólido. Un solo grupo incluye una sola partícula de sulfuro de cobre (I) con una o más moléculas funcionalizadas con alquino coordinadas a la misma. Una sola partícula de sulfuro de cobre (I) tiene muchos sitios potenciales de unión a alquino, cuyo número depende del tamaño de la partícula. El tamaño del grupo que se forma se define por el tamaño de la partícula de sulfuro de cobre (I) (que puede determinarse, por ejemplo, por dispersión dinámica de luz (DLS)) y el tamaño de la molécula funcionalizada con alquino que se usa. En algunos ejemplos, el grupo es un nanogruppo que tiene un tamaño que varía de aproximadamente 1 nm a menos de 1000 nm). En otros ejemplos, el grupo tiene un tamaño de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  o menos y, por lo tanto, puede ser un microgruppo o un nanogruppo.

Cuando se forma la sustancia, el primer ejemplo de la mezcla de injerto es una mezcla líquida que puede incluir el disolvente, la sustancia catalíticamente activa (que puede disolverse en el disolvente) y cualquier partícula mineral de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar. El primer ejemplo de la mezcla de injerto puede almacenarse (por ejemplo, hasta aproximadamente 50 días si el periodo de incubación es más corto), se usa como está en una reacción

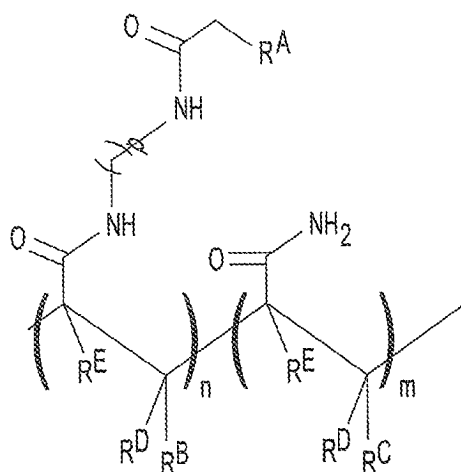
con el polímero funcionalizado con azida, o se somete a un proceso que elimina las partículas minerales de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar antes de usarse en una reacción con el polímero funcionalizado con azida. Por tanto, aunque no se muestra en la Fig. 1, un ejemplo del método 100 puede incluir filtrar mineral de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar de la sustancia catalíticamente activa en el primer ejemplo de la mezcla de injerto antes de hacer reaccionar la sustancia catalíticamente activa con la molécula que contiene azida.

Para eliminar las partículas minerales de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar, el primer ejemplo de la mezcla de injerto puede filtrarse o sedimentarse. La filtración se puede lograr usando cualquier filtro adecuado que elimine las partículas minerales de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar del primer ejemplo de la mezcla de injerto. En un ejemplo, se usa un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . El tamaño del filtro puede depender del tamaño de partícula promedio del mineral de sulfuro de cobre (I) usado en el proceso. La sedimentación se puede lograr mediante centrifugación y luego eliminando el líquido de las partículas sedimentadas. Después de filtrar, o sedimentar, o algún otro proceso para separar el mineral de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar del resto del primer ejemplo de la mezcla de injerto, el primer ejemplo de la mezcla de injerto es una mezcla líquida que puede incluir el disolvente y la sustancia catalíticamente activa disuelta o dispersada en el disolvente. Cuando se filtran las partículas minerales de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar, el primer ejemplo de la mezcla de injerto puede pasar de ser negro a ser sustancialmente incoloro, o tener un color azul ligeramente transparente.

El primer ejemplo almacenado o no almacenado y filtrado o sin filtrar de la mezcla de injerto puede combinarse luego con una molécula funcionalizada con

azida para hacer reaccionar la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida para acoplar la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida.

La molécula funcionalizada con azida puede ser cualquier molécula (por ejemplo, monómero, polímero, etc.) que incluye un grupo funcional azida para reaccionar con el alquino de la sustancia catalíticamente activa. Un ejemplo de la molécula funcionalizada con azida incluye un polímero de acrilamida, como poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida, PAZAM. PAZAM, y otras formas de copolímero de acrilamida, generalmente están representados por una unidad recurrente de Fórmula (I):



(I)

en donde:

$R^A$  se selecciona entre el grupo que consiste en azido, amino opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, hidrazona opcionalmente sustituida, hidrazina opcionalmente sustituida, carboxilo, hidroxilo, tetrazol opcionalmente sustituido, tetrazina opcionalmente sustituida, óxido de nitrilo, nitronas y tiol;

$R^B$  es H o alquilo opcionalmente sustituido;

$R^C$ ,  $R^D$ , y  $R^E$  se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H y alquilo opcionalmente sustituido;

cada uno de los  $-(CH_2)_p-$  puede estar opcionalmente sustituido;

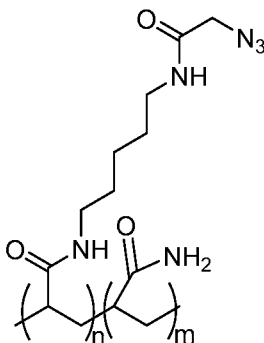
5  $p$  es un número entero en el intervalo de 1 a 50;

$n$  es un número entero en el intervalo de 1 a 50.000; y

$m$  es un número entero en el intervalo de 1 a 100.000.

Un experto en la materia reconocerá que la disposición de las características recurrentes "n" y "m" en la Fórmula (I) son representativas, y las subunidades monoméricas pueden estar presentes en cualquier orden en la estructura del polímero (por ejemplo, aleatoria, bloque, estampado, o una combinación de los mismos).

Los ejemplos específicos de PAZAM están representados por:



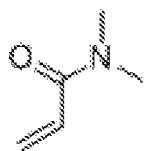
15 en donde  $n$  es un número entero en el intervalo de 1-20.000, y  $m$  es un número entero en el intervalo de 1-100.000. Al igual que con la Fórmula (I), un experto en la materia reconocerá que las subunidades "n" y "m" son unidades recurrentes que están presentes en orden aleatorio en toda la estructura del polímero.

El peso molecular de la Fórmula (I) o el polímero PAZAM puede variar de  
20 aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 1500 kDa, o puede ser, en un

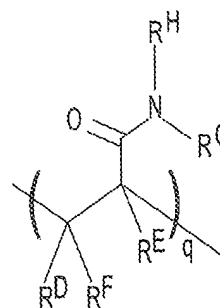
ejemplo específico, aproximadamente 312 kDa.

En algunos ejemplos, el polímero de Fórmula (I) o PAZAM es un polímero lineal. En algunos otros ejemplos, el polímero de Fórmula (I) o PAZAM es un polímero ligeramente reticulado.

- 5 En otros ejemplos, la molécula funcionalizada con azida puede ser una variación de la Fórmula (I). En un ejemplo, la unidad de acrilamida se puede



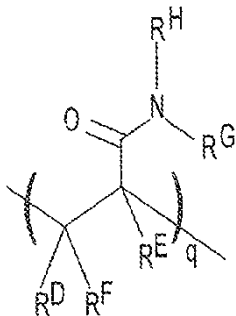
reemplazar con *N,N*-dimetilacrilamida ). En este ejemplo, la unidad de



acrilamida en la Fórmula (I) puede reemplazarse con , donde  $R^D$ ,

$R^E$ , y  $R^F$  son cada uno H, y  $R^G$  y  $R^H$  son cada uno un grupo metilo (en lugar de H

- 10 como es el caso con la acrilamida). En este ejemplo,  $q$  puede ser un número entero en el intervalo de 1 a 100.000. En otro ejemplo, la *N', N'*-di metilacrilamida se puede usar además de la unidad de acrilamida. En este ejemplo, La fórmula



(I) puede incluir además de las funciones recurrentes "n" y "m", donde  $R^D$ ,  $R^E$ , y  $R^F$  son cada uno H, y  $R^G$  y  $R^H$  son cada uno un grupo metilo.

En este ejemplo, q puede ser un número entero en el intervalo de 1 a 100.000.

Debe entenderse que pueden usarse otras moléculas funcionalizadas con azida, siempre que incluyan el grupo funcional azida para reaccionar con la molécula funcionalizada con alquino, por ejemplo, interactuando con la sustancia catalíticamente activa. Otros ejemplos de moléculas funcionalizadas con azida adecuadas incluyen otros polímeros de poliacrilamida azidolizados o una versión azidolizada de acrilamida libre de silano (SFA).

La sustancia catalíticamente activa (del primer ejemplo de la mezcla de injerto) y la molécula funcionalizada con azida pueden mezclarse entre sí, y los nanogrupos de sulfuro de cobre (I) de la sustancia actúan como la fuente de  $\text{Cu}^+$  para la reacción de cicloadición de azida-alquino entre la sustancia catalíticamente activa y la molécula funcionalizada con azida. La cicloadición forma azoles para unir la molécula funcionalizada con azida a la sustancia catalíticamente activa. En un ejemplo más específico, la cicloadición forma azoles para unir el grupo alquino de un cebador al grupo azida de un polímero. Una vez que el alquino se une a un sitio de superficie disponible en la partícula de sulfuro de cobre (I), la azida luego se une a ese sitio de la superficie también (a través de la coordinación con  $\text{Cu}^+$ ), que forma un estado de transición para la etapa de formación de enlace C-N. Cualquier producto de 1,2,3-triazol que forma disociados de la partícula de sulfuro de cobre (I).

El líquido del primer ejemplo de la mezcla de injerto puede estar presente durante la reacción de cicloadición de azida-alquino.

En algunos ejemplos del método 100 desvelados en el presente documento, la reacción de cicloadición de azida-alquino puede tener lugar en una superficie de una celda de flujo. En estos ejemplos, la molécula

funcionalizada con azida puede ser una capa de polímero en el sustrato de la celda de flujo, y el primer ejemplo de la mezcla de injerto puede exponerse a esta capa de polímero. En algunos ejemplos, antes de hacer reaccionar la sustancia catalíticamente activa con la molécula funcionalizada con azida, el método 100  
5 comprende además formar una capa de la molécula funcionalizada con azida en una superficie de una celda de flujo (por ejemplo, un sustrato de celda de flujo), y la sustancia catalíticamente activa se hace reaccionar con la capa de la molécula funcionalizada con azida en la superficie del flujo celda para formar una capa funcionalizada. Los ejemplos de estos métodos se describirán  
10 adicionalmente en referencia a las Figs. 2A-E y 3A-3D.

En otro ejemplo del método 100, se usa un segundo ejemplo de la mezcla de injerto. En este ejemplo, la molécula funcionalizada con alquino se puede añadir al disolvente para formar una solución, y la solución se puede combinar con la molécula funcionalizada con azida.

15 El mineral de sulfuro de cobre (I) se puede añadir a la solución, incluidas las moléculas funcionalizadas con alquino y azida. Al principio, el segundo ejemplo de la mezcla de injerto incluye el disolvente, la molécula funcionalizada con alquino, la molécula funcionalizada con azida y el mineral sulfuro de cobre (I). A medida que ocurren las reacciones, el segundo ejemplo de la mezcla de injerto  
20 puede incluir la sustancia catalíticamente activa, la molécula funcionalizada con azida, y cualquier molécula funcionalizada con alquino sin reaccionar y mineral de sulfuro de cobre (I), o un producto de reacción azida-alquino (es decir, el producto de reacción de la sustancia catalíticamente activa y la molécula funcionalizada con azida), y cualquiera de los otros componentes que no han  
25 reaccionado.

Cualquiera de los materiales, y/o cantidades/concentraciones establecidas para el primer ejemplo de la mezcla de injerto pueden usarse para formar el segundo ejemplo de la mezcla de injerto.

Una vez que se prepara el segundo ejemplo de la mezcla de injerto, el  
5 segundo ejemplo de la mezcla de injerto se mantiene a una temperatura que está por encima del punto de congelación del disolvente y por debajo del punto de ebullición del disolvente durante un periodo de incubación de hasta aproximadamente 50 días. Por tanto, la temperatura a la que se mantiene la mezcla depende, en parte, del disolvente usado para la reacción. Se ha  
10 encontrado que el producto de reacción azida-alquino formado como resultado de las reacciones es estable y activo cuando se incuba durante aproximadamente 50 días. Debe entenderse, sin embargo, que el periodo de incubación puede ser más largo si, al final del periodo, el producto de reacción azida-alquino permanece estable y activo. En algunos ejemplos, mantener el  
15 segundo ejemplo de la mezcla de injerto implica permitir que la mezcla repose durante el periodo de incubación sin ningún calentamiento adicional. En otros ejemplos, mantener el segundo ejemplo de la mezcla de injerto implica calentar la mezcla a la temperatura deseada. Por ejemplo, mantener el segundo ejemplo de la mezcla de injerto puede implicar calentar el segundo ejemplo de la mezcla  
20 de injerto a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 60 °C durante un tiempo que varía de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos.

Para eliminar las partículas minerales de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar, el segundo ejemplo de la mezcla de injerto puede filtrarse o  
25 sedimentarse. La filtración se puede lograr usando cualquier filtro adecuado que

elimine las partículas minerales de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar del segundo ejemplo de la mezcla de injerto. En un ejemplo, se usa un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . El tamaño del filtro puede depender del tamaño de partícula promedio del mineral de sulfuro de cobre (I) usado en el proceso. La sedimentación se puede lograr mediante centrifugación y luego eliminando el líquido de las partículas sedimentadas. Después de filtrar, o sedimentar u otro proceso para separar el mineral de sulfuro de cobre (I) sin reaccionar del resto del segundo ejemplo de la mezcla de injerto, el segundo ejemplo de la mezcla de injerto es una mezcla líquida que puede incluir el disolvente y el producto de reacción azida-alquino disuelto o dispersado en el disolvente.

En algunos otros ejemplos del método 100 desvelados en el presente documento, el segundo ejemplo de la mezcla de injerto puede usarse para formar la capa funcionalizada sobre el sustrato de la celda de flujo o la superficie de soporte. En estos ejemplos, el segundo ejemplo de la mezcla de injerto puede aplicarse a la superficie de sustrato/soporte de la celda de flujo, y un grupo funcional del producto de reacción de azida-alquino puede reaccionar con el grupo o grupos funcionales en la superficie de la celda de flujo para unir la azida. producto de reacción de alquino a la superficie y formar la capa funcionalizada. Los ejemplos de estos métodos se describirán adicionalmente en referencia a las Figs. 2A, 2B y 2E y 3 A, 3B y 3D.

Debe entenderse que la química de la superficie (por ejemplo, la capa funcionalizada) puede agregarse a una superficie de un sustrato estampado o un sustrato sin diseño. La adición de la química de la superficie al sustrato estampado se describirá en referencia a las Figs. 2A a 2E y la adición de la química de la superficie al sustrato sin diseño se describirá en referencia a las

Figs. 3 A a 3D.

La figura 2A es una vista en sección transversal del sustrato estampado 12. El sustrato estampado 12 puede ser una oblea estampado o un troquel estampado o cualquier otro sustrato estampado (por ejemplo, panel, la niña rectangular, etc.). Se puede usar cualquier ejemplo del sustrato 12 descrito en el presente documento. La oblea estampado puede usarse para formar varias celdas de flujo, y el troquel estampado puede usarse para formar una sola celda de flujo. En un ejemplo, el sustrato puede tener un diámetro que varía de aproximadamente 2 mm a aproximadamente 300 mm, o una lámina o panel rectangular que tiene su dimensión más grande de hasta 10 pies (~ 3 metros). En un ejemplo, la oblea de sustrato tiene un diámetro que varía de aproximadamente 200 mm a aproximadamente 300 mm. En otro ejemplo, la matriz del sustrato tiene un ancho que varía de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm. Aunque se han proporcionado dimensiones de ejemplo, debe entenderse que pueden usarse sustratos con cualquier dimensión adecuada.

El sustrato estampado 12 incluye depresiones 14 definidas sobre o en una capa expuesta o superficie del sustrato 12, y regiones intersticiales 16 que separan depresiones adyacentes 14. En los ejemplos desvelados en el presente documento, las depresiones 14 se funcionalizan con la química de la superficie (por ejemplo, 20, 22), mientras que las regiones intersticiales 16 pueden usarse para la unión pero no tendrán cebador(es) 22 (mostrados en las Fig. 2E) presentes en ellas.

Las depresiones 14 pueden fabricarse en o sobre el sustrato 12 usando una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, fotolitografía, litografía por

nanoimpresión, técnicas de estampado, técnicas de relieve, técnicas de moldeado, técnicas de micrograbado, técnicas de impresión, etc. Como apreciarán los expertos en la materia, la técnica usada dependerá de la composición y la forma del sustrato 12.

5           Se pueden prever muchos diseños diferentes de las depresiones 14, incluyendo regular, patrones repetitivos, y no regulares. En un ejemplo, las depresiones 14 están dispuestas en una rejilla hexagonal para un empaquetamiento aproximado y una densidad mejorada. Otros diseños pueden incluir, por ejemplo, diseños rectilíneos (es decir, rectangulares), diseños  
10   triangulares, etc. En algunos ejemplos, el diseño o patrón puede ser un formato x-y de depresiones 14 que están en filas y columnas. En algunos otros ejemplos, el diseño o patrón puede ser una disposición repetitiva de depresiones 14 y/o regiones intersticiales 16. En otros ejemplos más, el diseño o patrón puede ser una disposición aleatoria de depresiones 14 y/o regiones intersticiales 16. El  
15   patrón puede incluir puntos, almohadillas, pocillos, pernos, tiras, remolinos, cableados, triángulos, rectángulos, círculos, arcos, cheques, cuadros, diagonales, flechas, cuadrados, y/o sombreados cruzados.

          El diseño o patrón puede caracterizarse con respecto a la densidad de las depresiones 14 (es decir, el número de depresiones 14) en un área definida. Por  
20   ejemplo, las depresiones 14 pueden estar presentes en una densidad de aproximadamente 2 millones por  $\text{mm}^2$ . La densidad puede ajustarse a diferentes densidades que incluyen, por ejemplo, una densidad de al menos aproximadamente 100 por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 1.000 por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 0,1 millones por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 1 millones por  $\text{mm}^2$ ,  
25   aproximadamente 2 millones por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 5 millones por  $\text{mm}^2$ ,

aproximadamente 10 millones por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 50 millones por  $\text{mm}^2$ , o más. Como alternativa o de modo adicional, la densidad puede ajustarse para que no supere aproximadamente 50 millones por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 10 millones por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 5 millones por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 2 millones por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 1 millones por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 0,1 millones por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 1.000 por  $\text{mm}^2$ , aproximadamente 100 por  $\text{mm}^2$ , o menos. Debe entenderse además que la densidad de las depresiones 14 en el sustrato 12 puede estar entre uno de los valores inferiores y uno de los valores superiores seleccionados de los intervalos anteriores. Como ejemplos, una matriz de alta densidad puede caracterizarse por tener depresiones 14 separadas por menos de aproximadamente 100 nm, una matriz de densidad media puede caracterizarse por tener depresiones 14 separadas por aproximadamente 400 nm a aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , y una matriz de baja densidad puede caracterizarse por tener depresiones 14 separadas por más de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . Aunque se han proporcionado densidades de ejemplo, debe entenderse que pueden usarse sustratos con cualquier densidad adecuada.

El diseño o patrón también se puede caracterizar o alternativamente en términos del tono promedio, es decir, el espacio desde el centro de la depresión 14 hasta el centro de una región intersticial adyacente 16 (espacio de centro a centro). El patrón puede ser regular, tal que el coeficiente de variación alrededor del tono promedio es pequeño, o el patrón puede ser no regular, en cuyo caso el coeficiente de variación puede ser relativamente grande. En cualquier caso, el tono promedio puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 10 nm, aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ ,

aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  o más. Como alternativa o de modo adicional, el tono promedio puede ser, por ejemplo, como máximo aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ ,  
 5 aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ , o menos. El tono promedio para un patrón particular de sitios 16 puede estar entre uno de los valores más bajos y uno de los valores más altos seleccionados entre los intervalos anteriores. En un ejemplo, las depresiones 14 tienen un paso (espacio de centro a centro) de aproximadamente 1,5  $\mu\text{m}$ . Aunque se han proporcionado ejemplos de valores de tono promedio,  
 10 debe entenderse que pueden usarse otros valores de tono promedio.

En el ejemplo que se muestra en las Figs. 2A a 2E, las depresiones 14 son pocillos 14' y, por lo tanto, el sustrato estampado 12 incluye una serie de pocillos 14' en una superficie de las mismas. Los pocillos 14' pueden ser micropocillos o nanopocillos. El tamaño de cada pocillo 14' puede caracterizarse  
 15 por su volumen, área de abertura del pocillo, profundidad y/o diámetro.

Cada pocillo 14' puede tener cualquier volumen que sea capaz de confinar un líquido. Se puede seleccionar el volumen mínimo o máximo, por ejemplo, para acomodar el rendimiento (por ejemplo, multiplexidad), resolución, composición analítica, o reactividad analítica esperada para usos posteriores de la celda de  
 20 flujo. Por ejemplo, el volumen puede ser al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$ , aproximadamente  $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ , aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}^3$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}^3$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}^3$ , aproximadamente 100  $\mu\text{m}^3$ , o más. Como alternativa o de modo adicional, el volumen puede ser como máximo aproximadamente  $1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ , aproximadamente  $1 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ ,  
 25 aproximadamente 100  $\mu\text{m}^3$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}^3$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}^3$ ,

aproximadamente  $0,1 \mu\text{m}^3$ , o menos. Debe entenderse que la capa de revestimiento funcionalizada puede llenar todo o parte del volumen de un pocillo 14'. El volumen de la capa de revestimiento en un pocillo individual 14' puede ser mayor que, menor que o entre los valores especificados anteriormente.

5 El área ocupada por cada pocillo que se abre en una superficie se puede seleccionar basándose en criterios similares a los establecidos anteriormente para el volumen del pocillo. Por ejemplo, el área para cada pocillo que se abre en una superficie puede ser al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$ , aproximadamente  $0,1 \mu\text{m}^2$ , aproximadamente  $1 \mu\text{m}^2$ , aproximadamente  $10 \mu\text{m}^2$ , aproximadamente  $100 \mu\text{m}^2$ , o más. Como alternativa o de modo adicional, el área puede ser como máximo aproximadamente  $1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ , aproximadamente  $100 \mu\text{m}^2$ , aproximadamente  $10 \mu\text{m}^2$ , aproximadamente  $1 \mu\text{m}^2$ , aproximadamente  $0,1 \mu\text{m}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$ , o menos. El área ocupada por la apertura de cada pocillo puede ser mayor que, menor que o entre los valores especificados anteriormente.

La profundidad de cada pocillo 14' puede ser de al menos aproximadamente  $0,1 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $100 \mu\text{m}$  o más. Como alternativa o de modo adicional, la profundidad puede ser como máximo  $1 \times 10^3 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $100 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,1 \mu\text{m}$ , o menos. La profundidad de cada pocillo 14' puede ser mayor que, menor que o entre los valores especificados anteriormente.

En algunos casos, el diámetro de cada pocillo 14' puede ser de al menos aproximadamente  $50 \text{ nm}$ , aproximadamente  $0,1 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,5 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $100 \mu\text{m}$  o

más. Como alternativa o de modo adicional, el diámetro puede ser como máximo aproximadamente  $1 \times 10^3 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $100 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,5 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,1 \mu\text{m}$ , o menos (por ejemplo, aproximadamente  $50 \text{ nm}$ ). El diámetro de cada pocillo  
5 14' puede ser mayor que, menor que o entre los valores especificados anteriormente.

El sustrato estampado 12 puede exponerse a una serie de procesos para añadir la química de superficie 20, 22 en la depresión(depresiones) 14.

Aunque no se muestra, debe entenderse que el sustrato estampado 12  
10 puede exponerse a una ceniza de plasma para limpiar y activar la superficie. Por ejemplo, el proceso de incineración por plasma puede eliminar el material orgánico e introducir grupos hidroxilo o carboxilo en la superficie. Se pueden usar otros procesos de limpieza adecuados para limpiar el sustrato 12, dependiendo, en parte, del tipo de sustrato 12. Por ejemplo, la limpieza química puede  
15 realizarse con agentes oxidantes o soluciones cáusticas. Debe entenderse que si la molécula funcional azida puede unirse a los grupos funcionales -OH en la superficie, no se puede usar preparación adicional de la superficie del sustrato.

El sustrato estampado 12 (mostrado en la Fig. 2A) puede exponerse luego a un proceso que preparará la superficie 12 para la deposición de la molécula  
20 azida funcional para formar la capa de polímero 20 (Fig. 2C) o para la deposición del segundo ejemplo de la mezcla de injerto para formar la capa funcionalizada 24 (Fig. 2E). En un ejemplo, el sustrato estampado 12 puede exponerse a silanización, que une un silano o el derivado de silano 18 (Fig. 2B) a la superficie del sustrato estampado 12. La silanización introduce el silano o el derivado de  
25 silano 18 a través de la superficie, incluso en la depresión 14, 14' (por ejemplo,

en la superficie inferior y a lo largo de las paredes laterales) y en las regiones intersticiales 16.

La silanización se puede lograr usando cualquier silano o derivado de silano 18. La selección del silano o derivado de silano 18 puede depender, en parte, de la molécula funcionalizada con azida que se usará para formar la capa de polímero 20 (mostrada en la Fig. 2C) o que se usa en la segunda mezcla de injerto, ya que puede ser deseable formar un enlace covalente entre el silano o el derivado de silano 18 y la capa de polímero 20 o la molécula funcionalizada con azida en la segunda mezcla de injerto. El método usado para unir el silano o el derivado de silano 18 al sustrato 12 puede variar dependiendo del silano o derivado de silano 18 que se esté usando. En el presente documento se exponen varios ejemplos.

En un ejemplo, el silano o el derivado de silano 18 es (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) o 3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS) (es decir,  $X-R^B-Si(OR^C)_3$ , en donde X es amino,  $R^B$  es  $-(CH_2)_3-$ , y  $R^C$  es etilo o metilo). En este ejemplo, la superficie del sustrato 12 puede tratarse previamente con el (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) o el 3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS) para unir covalentemente el silicio a uno o más átomos de oxígeno en la superficie (sin la intención de ser retenido por el mecanismo, cada silicio puede unirse a uno, dos o tres átomos de oxígeno). Esta superficie tratada químicamente se hornea para formar una monocapa de grupo amina. Los grupos amina se hacen reaccionar luego con Sulfo-HSAB para formar un derivado azido. La activación UV a 21 °C con 1 J/cm<sup>2</sup> a 30 J/cm<sup>2</sup> de energía genera una especie activa de nitreno, que puede sufrir fácilmente una variedad de reacciones de inserción con PAZAM (por ejemplo, la molécula funcionalizada con azida).

También se pueden usar otros métodos de silanización. Ejemplos de métodos de silanización adecuados incluyen deposición de vapor, el método YES, revestimiento por rotación, u otros métodos de deposición. En el presente documento se describen algunos ejemplos de métodos y materiales que pueden  
5 usarse para silanizar el sustrato 12, aunque debe entenderse que pueden usarse otros métodos y materiales.

En un ejemplo que usa el horno YES CVD, el sustrato estampado 12 se coloca en el horno CVD. La cámara puede ventilarse y luego comenzar el ciclo de silanización. Durante el ciclado, el silano o el recipiente derivado de silano se  
10 puede mantener a una temperatura adecuada (por ejemplo, aproximadamente 120 °C para el silano de norborneno), las líneas de vapor de silano o derivados de silano se mantienen a una temperatura adecuada (por ejemplo, aproximadamente 125 °C para el silano norborneno), y las líneas de vacío se  
15 mantienen a una temperatura adecuada (por ejemplo, aproximadamente 145 °C).

En otro ejemplo, el silano o el derivado de silano 18 (por ejemplo, silano norborneno líquido) puede depositarse dentro de un vial de vidrio y colocarse dentro de un desecador de vidrio al vacío con un sustrato estampado 12. El desecador se puede evacuar a una presión que varía de aproximadamente 15  
20 mTorr a aproximadamente 30 mTorr, y se coloca dentro de un horno a una temperatura que varía de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 125 °C. Se deja proceder a la silanización y luego se retira el desecador del horno, se enfría y ventila en aire.

La deposición de vapor, el método YES y/o el desecador de vacío se  
25 pueden usar con una variedad de silano o derivado de silano 18, tales como

aquellos silanos o derivados de silano 18 que incluyen ejemplos de los restos insaturados desvelados en el presente documento. Como ejemplos, estos métodos pueden usarse cuando el silano o el derivado de silano 18 incluye un resto cicloalqueno insaturado, como norborneno, un derivado de norborneno (por ejemplo, un (hetero)norborneno que incluye un oxígeno o nitrógeno en lugar de uno de los átomos de carbono), transcicloocteno, derivados de transcicloocteno, transciclopenteno, transciclohepteno, transciclononeno, biciclo[3.3.1]non-1-eno, biciclo[4.3.1]dec-1(9)-eno, biciclo[4.2.1]non-1(8)-eno y biciclo[4.2.1]non-1-eno. Cualquiera de estos cicloalquenos puede ser sustituido, por ejemplo, con un grupo R, como hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, heteroalíciclilo, aralquilo o (heteroalíciclil)alquilo. Un ejemplo del derivado de norborneno incluye [(5-biciclo[2.2.1]hept-2-enil)etil]trimetoxisilano. Como otros ejemplos, estos métodos pueden usarse cuando el silano o el derivado de silano 18 incluye un resto cicloalquino insaturado, como ciclooctino, un derivado de ciclooctino, o biciclonononinos (por ejemplo, biciclo[6.1.0]non-4-ino o derivados del mismo, biciclo[6.1.0]non-2-ino, o biciclo[6.1.0]non-3-ino). Estos cicloalquinos pueden estar sustituidos con cualquiera de los grupos R descritos en el presente documento.

Como se muestra en la Fig. 2B, la unión del silano o derivado de silano 18 forma un sustrato estampado silanizado, incluyendo depresiones silanizadas y regiones intersticiales silanizadas.

En el ejemplo que se muestra en la Fig. 2C, el sustrato estampado silanizado puede exponerse luego a un proceso que formará la capa de polímero en las depresiones silanizadas y las regiones intersticiales silanizadas.

Como se describe en el presente documento, los ejemplos de la molécula

funcionalizada con azida (usada para formar el polímero 20) incluyen PAZAM, o cualquier otra molécula que esté funcionalizada para interactuar con la oblea estampada 12 y el o los cebadores 22 aplicados posteriormente (como parte del complejo catalíticamente activo). La molécula funcionalizada con azida puede estar presente en una solución. En un ejemplo, la solución incluye PAZAM en una mezcla de etanol y agua. La capa de polímero 20 puede formarse en la superficie de la oblea estampada silanizada (es decir, sobre las depresiones silanizadas y las regiones intersticiales silanizadas) usando cualquier técnica adecuada. La molécula funcionalizada con azida se puede depositar sobre la superficie del sustrato estampado 12 usando recubrimiento por rotación, o recubrimiento por inmersión o inmersión, o el flujo de la molécula funcionalizada por azida bajo presión positiva o negativa, u otras técnicas adecuadas. La capa resultante 20 se muestra en la Fig. 2C.

La unión de la capa de polímero 20 a las depresiones silanizadas y las regiones intersticiales silanizadas (es decir, 18) puede realizarse mediante unión covalente. La unión covalente de la capa de polímero 20 a las depresiones silanizadas es útil para mantener la capa de polímero 20 en las depresiones 14, 14' durante toda la vida útil de la celda de flujo finalmente formada durante una variedad de usos. Los siguientes son algunos ejemplos de reacciones que pueden tener lugar entre el silano o el derivado de silano 18 y la capa de polímero 20.

Cuando el silano o el derivado de silano 18 incluye norborneno o un derivado de norborneno como el resto insaturado, el norborneno o un derivado de norborneno puede sufrir una reacción de cicloadición 1,3-dipolar con un grupo azida/azido de PAZAM.

Cuando el silano o el derivado de silano 18 incluye ciclooctino o un derivado de ciclooctino como el resto insaturado, el ciclooctino o derivado de ciclooctino puede sufrir una reacción de 1,3-cicloadición azida-alquino (SPAAC) promovida por cepa con una azida/azido de PAZAM.

- 5            Cuando el silano o el derivado de silano 18 incluye un biclcnnoneno como el resto insaturado, el biclcnnoneno puede experimentar una cicloadición de alquino SPAAC similar con azidas a PAZAM debido a la tensión en el sistema anular bicíclico.

Aunque no se muestra, debe entenderse que en algunos ejemplos del  
10 método, el sustrato estampado 12 no puede exponerse a silanización. Más bien, el sustrato estampado 12 puede exponerse a cenizas de plasma, y luego la molécula funcionalizada con azida puede revestirse por rotación (o depositarse de otro modo) sobre el sustrato estampado 12 de cenizas plasma para formar la capa de polímero 20. En este ejemplo, la ceniza de plasma puede generar  
15 agente(s) de activación de superficie (por ejemplo, grupos -OH) que pueden adherir la capa de polímero 20 al sustrato estampado 12. En estos ejemplos, la capa de polímero 20 se selecciona para que reaccione con los grupos de superficie generados por la ceniza de plasma.

Después de revestirse, la molécula funcionalizada con azida también  
20 puede exponerse a un proceso de curado para formar la capa de polímero 20 en todo el sustrato estampado (es decir, en depresión(depresiones) y región(regiones) intersticial(es). En un ejemplo, el curado de la molécula funcionalizada con azida puede tener lugar a una temperatura que varía desde la temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 25 °C) hasta  
25 aproximadamente 60 °C durante un tiempo que varía desde aproximadamente 5

minutos hasta aproximadamente 2 horas.

El sustrato estampado silanizado y revestido (que se muestra en la Fig. 2C) puede exponerse a un proceso de limpieza. Este proceso puede usar un baño de agua y sonicación. El baño de agua se puede mantener a una temperatura relativamente baja que varía de aproximadamente 22 °C a 5 aproximadamente 45 °C. En otro ejemplo, la temperatura del baño de agua varía de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C.

El sustrato estampado silanizado y revestido se expone luego a pulido para eliminar la(s) parte(s) de la capa de polímero 20 de las regiones 10 intersticiales silanizadas. El sustrato estampado silanizado, revestido y pulido se muestra en la Fig. 2D. Las partes del silano o derivado de silano 18 que están adyacentes a las regiones intersticiales 16 pueden o no eliminarse como resultado del pulido. Por tanto, en las Figs. 2D y 2E, las partes del silano o derivado de silano 18 que son adyacentes a las regiones intersticiales 16 se 15 muestran en forma fantasma, ya que pueden permanecer al menos parcialmente después del pulido o pueden eliminarse después del pulido. Cuando estas partes silanizadas se eliminan por completo, debe entenderse que el sustrato subyacente 12 está expuesto.

El proceso de pulido puede realizarse con una suspensión química suave 20 (que incluye, por ejemplo, un abrasivo, un tampón, un agente quelante, un tensioactivo y/o un dispersante) que puede eliminar la fina capa de polímero 20 y, en algunos casos, al menos parte del silano o derivado de silano 18, de las regiones intersticiales 16 sin afectar perjudicialmente el sustrato subyacente 12 en esas regiones. Como alternativa, el pulido puede realizarse con una solución 25 que no incluya las partículas abrasivas.

La suspensión química puede usarse en un sistema de pulido mecánico químico para pulir la superficie del sustrato estampado silanizado y revestido que se muestra en la figura 2C. La(s) cabeza(s)/almohadilla(s) de pulido u otra herramienta(s) de pulido puede pulir la capa de polímero 20 de las regiones intersticiales 16 mientras deja la capa de polímero 20 en las depresiones 14, 14' y deja el fondo sustrato 12 al menos sustancialmente intacto. Como ejemplo, el cabezal de pulido puede ser un cabezal de pulido Strasbaugh ViPRR II.

Como se ha mencionado anteriormente, el pulido se puede realizar con una almohadilla de pulido y una solución sin ningún abrasivo. Por ejemplo, la almohadilla de pulido se puede usar con una solución libre de partículas abrasivas (es decir, una solución que no incluye partículas abrasivas).

El pulido elimina parte(s) de la capa polimérica 20 (y en algunos casos al menos parte del silano o derivado de silano 18) de las regiones intersticiales 16 y deja parte(s) de la capa polimérica 20 en las depresiones silanizadas, como se muestra en la Figura 2D. También como se mencionó anteriormente, la(s) región(es) intersticial(es) 16 pueden permanecer silanizadas después de completar el pulido. En otras palabras, las regiones intersticiales silanizadas pueden permanecer intactas después del pulido. Alternativamente (como se indica por las partes fantasma de 18), el silano o el derivado de silano 18 se puede eliminar de la región o regiones intersticiales 16 como resultado del pulido.

Aunque no se muestra, debe entenderse que el sustrato estampado silanizado, revestido y pulido (que se muestra en la Fig. 2D) puede exponerse a un proceso de limpieza. Este proceso puede usar un baño de agua y sonicación. El baño de agua puede mantenerse a una temperatura relativamente baja que varía de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 30 °C. El sustrato

estampado silanizado, revestido y pulido también se puede secar por rotación o secar mediante otra técnica adecuada.

El sustrato estampado silanizado, revestido y pulido que se muestra en la Fig. 2D puede exponerse luego a un proceso de injerto para injertar el cebador 22 a la capa de polímero 20 en la(s) depresión(depresiones) 14, 14'. En este ejemplo, el injerto se puede lograr con revestimiento por inmersión, revestimiento por pulverización, distribución de pocillos, o mediante otro método adecuado que unirá los cebador(es) 22 de la sustancia catalíticamente activa a la capa de polímero 20 en al menos algunas de las depresiones 14, 14'. Cada una de estas técnicas de ejemplo usa el primer ejemplo de la mezcla de injerto desvelada en el presente documento, que incluye las sustancias catalíticamente activas. Estas sustancias introducen tanto el cebador(es) 22 a injertar como el catalizador de  $\text{Cu}^+$  para la reacción de cicloadición azida-alquino.

El revestimiento por inmersión puede implicar sumergir el sustrato estampado (que tiene la capa de polímero 20 en la(s) depresión(depresiones) 14, 14' del mismo) en una serie de baños con temperatura controlada. Los baños también pueden ser controlados por flujo y/o cubiertos con una capa de nitrógeno. Los baños pueden incluir el primer ejemplo de la mezcla de injerto. Durante los diversos baños, el cebador(es) 22 se unirán a la capa de polímero 20 en al menos algunas de las depresiones. En un ejemplo, el sustrato estampado revestido y pulido se introducirá en un primer baño que incluye el primer ejemplo de la mezcla de injerto donde tiene lugar una reacción de cicloadición de azida-alquino para unir los cebador(es) 22, y luego el sustrato estampado se moverá a baños adicionales para lavado. El sustrato estampado puede moverse de un baño a otro con un brazo robótico o manualmente.

También se puede usar un sistema de secado en el revestimiento por inmersión.

El revestimiento por pulverización se puede lograr pulverizando el primer ejemplo de la mezcla de injerto directamente sobre el sustrato estampado revestido y pulido. El sustrato revestido por pulverización se puede incubar hasta  
5 aproximadamente 60 minutos a una temperatura que varía de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 70 °C. Después de la incubación, el primer ejemplo de la mezcla de injerto se puede diluir y eliminar usando, por ejemplo, una revestidor centrífugo.

La distribución de pocillos se puede realizar de acuerdo con un método de  
10 piscina y centrifugado, y por lo tanto se puede lograr con un revestidor centrífugo. El primer ejemplo de la mezcla de injerto puede aplicarse (manualmente o mediante un proceso automatizado) al sustrato estampado revestido y pulido. El primer ejemplo aplicado de la mezcla de injerto puede aplicarse o extenderse por toda la superficie del sustrato estampado revestido y pulido. El primer ejemplo  
15 del sustrato estampado recubierto con mezcla de injerto puede incubarse durante un tiempo de hasta aproximadamente 90 minutos a una temperatura que varía de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 90 °C. Después de la incubación, el primer ejemplo de la mezcla de injerto se puede diluir y eliminar usando, por ejemplo, el revestidor centrífugo.

20 El injerto de los cebadores 22 de la(s) sustancia(s) catalíticamente activa(s) sobre la capa polimérica 20 forma la capa funcionalizada 24, como se muestra en la Fig. 2E.

En otro ejemplo del método, el polímero 20 no se aplica por separado de los cebadores 22. Más bien, el segundo ejemplo de la mezcla de injerto, que  
25 incluye el producto de reacción azida-alquino, puede usarse para formar la capa

funcionalizada 24 en un solo proceso.

Volviendo a la Fig. 2B, el sustrato estampado silanizado puede exponerse a pulido para eliminar parte(s) del silano o derivado de silano 18 de las regiones intersticiales silanizadas. Este proceso deja las depresiones 14, 14' silanizadas.

5 El segundo ejemplo de la mezcla de injerto puede aplicarse luego al sustrato estampado silanizado y pulido. La aplicación del segundo ejemplo de la mezcla de injerto se puede lograr mediante recubrimiento por inmersión, revestimiento por pulverización, distribución de pocillos, o por otro método adecuado. Cualquier grupo o grupos funcionales azida sin reaccionar del  
10 producto de reacción azida-alquino reaccionan con el silano o el derivado de silano 18 en al menos algunas de las depresiones 14, 14' como se describió previamente en referencia a la Fig. 2C. En un ejemplo, el producto de reacción azida-alquino incluye PAZAM (por ejemplo, polímero 20) unido al alquino del cebador 22, y cualquier azida no reaccionada del PAZAM puede reaccionar con  
15 el silano o el derivado de silano 18 para unir la reacción azida-alquino producto al sustrato estampado 12. A diferencia del primer ejemplo de la mezcla de injerto, que implica múltiples etapas para formar la capa funcionalizada 24 (descrita en las Figs. 2C-2E), usando el segundo ejemplo de la mezcla de injerto permite que la capa funcionalizada 24 (por ejemplo, la capa 20 con los cebadores 22 unidos)  
20 se forme en una sola aplicación (pasando de la Fig. 2B a la Fig. 2E).

Después de revestirse, el producto de reacción azida-alquino también puede exponerse a un proceso de curado para formar la capa funcionalizada 24 en la(s) región(regiones) de depresión(depresiones)). En un ejemplo, el curado del producto de reacción azida-alquino puede tener lugar a una temperatura que  
25 varía desde la temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 25 °C)

hasta aproximadamente 60 °C durante un tiempo que varía desde aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 2 horas.

La aplicación de la química superficial 20, 22 (es decir, la formación de la capa funcionalizada 24) puede realizarse de modo que una región de unión del sustrato modelado 12 permanezca expuesta. La región de unión del sustrato estampado 12 está generalmente ubicada en algunas de las regiones intersticiales 16 del sustrato estampado 12 donde una tapa se unirá al sustrato estampado 12. Cuando el sustrato estampado es una oblea, la región de unión puede definir los límites de varias celdas de flujo que se están formando a partir de la oblea. Cuando el sustrato estampado es un troquel, la región de unión puede definir los límites exteriores de una celda de flujo que se está formando.

Por tanto, algunos ejemplos del método 100 implican unir una tapa a la región de unión del sustrato modelado 12 para formar un canal de flujo que está en comunicación selectiva de fluido con la(s) depresión(depresiones) 14, 14'. Cuando el sustrato estampado 12 es una oblea, diferentes áreas de la pestaña pueden definir al menos parcialmente los canales de flujo respectivos que se están formando usando la oblea. Cuando el sustrato estampado 12 es un troquel, la pestaña puede definir el uno o más canales de flujo que se están formando.

La pestaña puede ser cualquier material que sea transparente a una luz de excitación que se dirija hacia la química de la superficie 20, 22 en la(s) depresión(depresiones) 14, 14'. Como ejemplos, la pestaña puede ser de vidrio (por ejemplo, borosilicato, sílice fundida, etc.), plástico, o similar. Un ejemplo disponible comercialmente de un vidrio de borosilicato adecuado es D 263®, disponible en Schott North America, Inc. Ejemplos disponibles comercialmente de materiales plásticos adecuados, es decir, polímeros de cicloolefina, son los

productos ZEONOR® disponibles en Zeon Chemicals L.P.

La pestaña puede unirse a la región de unión del sustrato estampado 12 usando cualquier técnica adecuada, como unión por láser, unión por difusión, unión anódica, unión eutéctica, enlace de activación de plasma, unión por frita  
5 de vidrio, u otros métodos conocidos en la técnica. En un ejemplo, se puede usar una capa espaciadora para unir la pestaña a la región de unión del sustrato estampado 12. La capa espaciadora puede ser cualquier material que selle al menos algunas de las regiones intersticiales 16 (por ejemplo, la región de unión) del sustrato modelado 12 y la pestaña juntas.

10 En un ejemplo, la capa espaciadora puede ser un material absorbente de radiación que absorbe radiación a una longitud de onda que es transmitida por la tapa y/o el sustrato estampado. La energía absorbida, a su vez, forma el enlace entre la capa espaciadora y la pestaña y entre la capa espaciadora y el sustrato estampado. Un ejemplo de este material absorbente de radiación es KAPTON®  
15 negro (poliimida que contiene negro de carbono) de DuPont (USA), que absorbe a aproximadamente 1064 nm. Debe entenderse que la poliimida podría usarse sin la adición de negro de humo, excepto que la longitud de onda tendría que ser alterada a una que sea significativamente absorbida por el material de poliimida natural (por ejemplo, 480 nm). Como otro ejemplo, la poliimida CEN JP puede  
20 unirse cuando se irradia con luz a 532 nm. Cuando la capa espaciadora es el material absorbente de radiación, la capa espaciadora puede colocarse en una interfaz entre la pestaña y el sustrato estampado de modo que la capa espaciadora contacte la región de unión deseada. Se puede aplicar compresión (por ejemplo, aproximadamente 100 PSI de presión) mientras se aplica energía  
25 láser a una longitud de onda adecuada a la interfaz (es decir, se irradia el material

absorbente de radiación). La energía del láser se puede aplicar a la interfaz tanto desde arriba como desde abajo para lograr una unión adecuada.

En otro ejemplo, la capa espaciadora puede incluir un material absorbente de radiación en contacto con la misma. El material absorbente de radiación puede aplicarse en la interfaz entre la capa espaciadora y la pestaña, así como en la interfaz entre la capa espaciadora y el sustrato estampado. Como ejemplo, la capa espaciadora puede ser poliimida y el material absorbente de radiación separado puede ser negro de humo. En este ejemplo, el material absorbente de radiación separado absorbe la energía láser que forma los enlaces entre la capa espaciadora y la pestaña y entre la capa espaciadora y el sustrato estampado. En este ejemplo, se puede aplicar compresión en las interfaces respectivas mientras se aplica energía láser a una longitud de onda adecuada a las interfaces (es decir, se irradia el material absorbente de radiación).

Cuando el sustrato estampado 12 es una oblea, la capa separadora y las paredes laterales (o conectadas a la pestaña) pueden separar físicamente un canal de flujo de un canal de flujo adyacente y pueden ubicarse en la periferia de las obleas. Cuando el sustrato estampado 12 es un troquel y la celda de flujo que se está formando debe incluir un solo canal o carril de flujo, la capa espaciadora y las paredes laterales (o conectadas a la pestaña) pueden ubicarse en la periferia de la matriz para definir el canal de flujo y sellar la celda de flujo. Cuando el sustrato modelado 12 es un troquel y la celda de flujo que se está formando debe incluir múltiples canales de flujo aislados (por ejemplo, ocho o cuatro canales de flujo), la capa separadora y las paredes laterales (o conectadas a la pestaña) pueden separar físicamente un canal/carril de flujo de un canal/carril de flujo adyacente y pueden estar ubicados en la periferia del troquel. Debe

entenderse, sin embargo, que la capa espaciadora y las paredes laterales pueden ubicarse en cualquier región deseada dependiendo de la implementación.

Cuando el sustrato estampado 12 es un troquel, la unión de la pestaña  
5 forma la celda de flujo. Cuando el sustrato estampado es una oblea, el método 100 puede implicar procesamiento adicional, como cortar en cubitos, después de que la pestaña quede unida. En un ejemplo, la pestaña puede unirse al sustrato estampado 12 y cortar en cubitos forma células de flujo individuales.

Como se ha mencionado anteriormente, la química de superficie 20, 22  
10 (capa funcionalizada 24) también se puede añadir a un sustrato no modelado 12', y estos ejemplos se describirán en referencia a las Figs. 3A a 3D. Con un sustrato no estampado 12', una superficie continua incluiría la misma química de superficie 20, 22 que se encuentra en los pocillos 14' de las Figs. 2A a 2E. Cualquiera de los sustratos desvelados en el presente documento puede usarse  
15 como sustrato no modelado 12', excepto que el sustrato no modelado 12' no incluye depresiones 14 o regiones intersticiales 16. En este método de ejemplo, la pestaña 26 (mostrada en la Fig. 3B) está unida al sustrato no estampado 12' desde el principio para formar los canales de flujo 30. La pestaña 26 puede ser cualquiera de los materiales y en cualquiera de las configuraciones descritas en  
20 el presente documento. La pestaña 26 también puede unirse al sustrato no estampado 12' mediante cualquiera de las técnicas descritas en el presente documento.

En el ejemplo que se muestra en la Fig. 3B, la pestaña 26 incluye una porción superior 27 formada integralmente con paredes laterales 29. Las paredes  
25 laterales 29 están unidas a una región de unión del sustrato no modelado 12'

mediante la capa espaciadora 28. La región de unión puede estar en una periferia del sustrato no modelado 12', o en cualquier área donde sea deseable formar un límite de un canal de flujo 30. En otros ejemplos, la capa separadora 28 puede formar las paredes laterales y puede estar unida a una tapa al menos sustancialmente plana 26.

Conjuntamente, la pestaña 26 (incluyendo las paredes laterales 29) y el sustrato no estampado 12' definen el canal de flujo 30. El canal de flujo 30 puede servir para, por ejemplo, introducir selectivamente fluidos para formar la química superficial 20, 22 e introducir selectivamente componentes de reacción o reactivos a la química superficial 20, 22 para iniciar reacciones designadas dentro del canal de flujo 30.

Antes de formar la capa de polímero 20 (que se muestra en la Fig. 3C), el método puede implicar exponer el sustrato no modelado 12' (a través de un proceso de flujo continuo) a un proceso de limpieza y/u otro proceso (por ejemplo, silanización) que prepara la superficie expuesta del sustrato no estampado 12' para el depósito posterior de la molécula funcionalizada con azida (para formar la capa 20) o el segundo ejemplo de la mezcla de injerto (para formar la capa funcionalizada 24).

La silanización del sustrato no modelado 12' se muestra en la Fig. 3B. En este ejemplo, la silanización une el silano o el derivado de silano 18 a las partes expuestas de la superficie de la oblea no estampada 12' que están presentes en el canal de flujo 30.

La silanización se puede lograr usando cualquier silano o derivado de silano 18. La selección del silano o derivado de silano 18 puede incluir un grupo funcional que puede formar un enlace covalente con la azida de la molécula

funcionalizada con azida (usada para formar la capa de polímero 20 que se muestra en la Fig. 3C), o con la azida de la azida producto de reacción de alquino en el segundo ejemplo de la mezcla de injerto (usado para formar la capa funcionalizada 24 mostrada en la Fig. 3D). El método usado para unir el silano o el derivado de silano 18 al sustrato 12' puede ser un proceso de flujo continuo.

Como se muestra en la Fig. 3C, en este ejemplo, la capa de polímero 20 se forma luego sobre el silano o el derivado de silano 18, o sobre otra química que se ha depositado para preparar la superficie expuesta del sustrato no estampado 12' dentro del canal de flujo 30.

Se puede usar cualquiera de las moléculas funcionalizadas con azida descritas en el presente documento. En este ejemplo, la formación de la capa de polímero puede lograrse mediante un proceso de flujo continuo. En el proceso continuo, la molécula funcionalizada con azida se puede introducir en los canales de flujo 30 a través de los puertos de entrada respectivos y se puede curar. La capa de polímero 20 se formará sobre la superficie expuesta del sustrato no estampado 12' y no se realiza el pulido.

Como se muestra en la Fig. 3D, el cebador 22 se injerta en la capa de polímero 20 en el canal de flujo 30 usando el primer ejemplo de la mezcla de injerto que incluye la sustancia o sustancias catalíticamente activas. En este ejemplo, el injerto puede lograrse mediante un proceso de flujo continuo. En el proceso continuo, el primer ejemplo de la mezcla de injerto descrita en el presente documento puede introducirse en los canales de flujo 30 a través de los puertos de entrada respectivos, puede mantenerse en los canales de flujo durante un tiempo suficiente (es decir, un periodo de incubación) para que tenga lugar la reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (I), que une

el cebador 22 a la capa de polímero 20 para formar la capa funcionalizada 24. El primer ejemplo de la mezcla de injerto se puede eliminar de los puertos de salida respectivos. Después de la unión al cebador, los fluidos adicionales pueden dirigirse a través de los canales de flujo para lavar los canales de flujo ahora  
5 funcionalizados 30. La celda de flujo resultante 10 en este ejemplo se muestra en la Fig. 3D.

En otro ejemplo del método, el polímero 20 no se aplica por separado de los cebadores 22. Más bien, el segundo ejemplo de la mezcla de injerto, que incluye el producto de reacción azida-alquino, puede usarse para formar la capa  
10 funcionalizada 24 en un solo proceso.

En este ejemplo, el segundo ejemplo de la mezcla de injerto se puede aplicar luego al sustrato silanizado sin diseño que se muestra en la Fig. 3B. La aplicación del segundo ejemplo de la mezcla de injerto se puede lograr mediante un proceso de flujo continuo. Cualquier grupo o grupos funcionales azida sin  
15 reaccionar del producto de reacción azida-alquino reaccionan con el silano o el derivado de silano 18 como se describió anteriormente en el presente documento. En un ejemplo, el producto de reacción azida-alquino incluye PAZAM (por ejemplo, polímero 20) unido al alquino del cebador 22, y cualquier azida no reaccionada del PAZAM puede reaccionar con el silano o el derivado  
20 de silano 18 para unir la reacción azida-alquino producto al sustrato no estampado 12. A diferencia del primer ejemplo de la mezcla de injerto, que implica múltiples etapas para formar la capa funcionalizada 24 (descrita en las Figs. 3C-3D), usando el segundo ejemplo de la mezcla de injerto permite que la capa funcionalizada 24 (por ejemplo, la capa 20 con los cebadores 22 unidos) se  
25 forme en una sola aplicación (pasando de la Fig. 3B a la Fig. 3D). También puede

realizarse el curado de la capa funcionalizada 24.

Aunque no se muestra, debe entenderse que el sustrato estampado 12 o el sustrato no estampado 12' puede incluir puertos de entrada y salida que deben engancharse de manera fluida con otros puertos (no mostrados) para dirigir fluido(s) a los canales de flujo respectivos (por ejemplo, desde un cartucho de reactivo u otro sistema de almacenamiento de fluidos) y fuera del canal de flujo (por ejemplo, a un sistema de eliminación de desechos).

Además, aunque no se muestra, debe entenderse que algunos ejemplos de la celda de flujo pueden fijarse directamente y, por lo tanto, estar en contacto físico con, un dispositivo de detección (no mostrado) mediante un o más mecanismos de seguridad (por ejemplo, adhesivo, unión, fijaciones, y similares). El dispositivo de detección puede incluir un dispositivo CMOS (que incluye una pluralidad de capas apiladas que incluyen, por ejemplo, capa(s) de silicio, capa(s) dieléctrica(s), capa(s) dieléctrica(s) metálica(s), capa(s) metálicas, etc.) y componentes ópticos. Los componentes ópticos pueden estar dispuestos de modo que un sensor óptico del dispositivo de detección esté al menos sustancialmente alineado y, por lo tanto, esté asociado operativamente con, una única guía de onda óptica del dispositivo de detección y la química de superficie 20, 22 dentro de una sola depresión 14, 14' o dentro de un canal de flujo 30 de la celda de flujo.

Además, aunque no se muestra, debe entenderse que en lugar de estar unido a una pestaña 26, un sustrato funcionalizado (con química de superficie, 20, 22 sobre el mismo o en la(s) depresión(depresiones) 14 del mismo) pueden unirse a otro sustrato funcionalizado con química de superficie, 20, 22 en el mismo en depresión(depresiones) del mismo. Las dos superficies

funcionalizadas pueden enfrentarse entre sí y pueden tener un canal de flujo definido entre ellas. Se puede usar una capa espaciadora y un método de unión adecuado para unir dos de los sustratos funcionalizados.

Las celdas de flujo descritas en el presente documento pueden usarse en una variedad de enfoques o tecnologías de secuenciación, incluyendo técnicas denominadas a menudo secuenciación por síntesis (SBS), secuenciación de matriz cíclica, secuenciación por ligamiento, pirosecuenciación, etc. Con cualquiera de estas técnicas y en ejemplos que usan un sustrato estampado, dado que la capa de polímero funcional 20 y el cebador(es) 22 de secuenciación unido(s) están presentes en las depresiones funcionalizadas (es decir, 14, 14' con química de superficie 20, 22 sobre ella) y no en las regiones intersticiales 16, La amplificación se limitará a las depresiones funcionalizadas. En otros ejemplos, la amplificación puede producirse a través de un canal de celda de flujo completo (por ejemplo, el canal 30).

Como un ejemplo, una reacción de secuenciación por síntesis (SBS) se puede ejecutar en un sistema como los sistemas secuenciadores HISEQ™, HISEQX™, MISEQ™, NOVASeq™ o NEXTSeq™ de Illumina (San Diego, CA). En SBS, la extensión de un cebador de ácido nucleico a lo largo de un molde de ácido nucleico se controla para determinar la secuencia de nucleótidos en el molde. El proceso químico subyacente puede ser polimerización (por ejemplo, catalizado por una enzima polimerasa) o ligamiento (por ejemplo, catalizado por una enzima ligasa). En un proceso SBS basado en polimerasa particular, los nucleótidos marcados con fluorescencia se añaden al cebador 22 (extendiendo así el cebador 22) de una manera dependiente del molde de modo que la detección del orden y tipo de nucleótidos añadidos al cebador 22 se pueda usar

para determinar la secuencia del molde. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, uno o más nucleótidos marcados, ADN polimerasa, etc., pueden administrarse en/a través del canal de flujo 30, etc. que alberga una serie de cebadores 22. Las depresiones funcionalizadas (es decir, 14, 14' con química de superficie 20, 22), donde la extensión del cebador hace que se incorpore un nucleótido marcado, se puede detectar mediante un suceso de imagen. Durante un suceso de imagen, un sistema de iluminación (no mostrado) puede proporcionar una luz de excitación a las depresiones funcionalizadas (es decir, 14, 14' con química de superficie 20, 22 sobre la misma).

En algunos ejemplos, los nucleótidos pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que termina una extensión adicional del cebador una vez que se ha agregado un nucleótido al cebador 22. Por ejemplo, un análogo de nucleótido que tiene un resto terminador reversible se puede añadir al cebador 22 de modo que la extensión posterior no pueda ocurrir hasta que se libere un agente de desbloqueo para eliminar el resto. Por lo tanto, para ejemplos que usan terminación reversible, se puede suministrar un reactivo de desbloqueo al canal de flujo 30, etc. (antes o después de que ocurra la detección).

Los lavados pueden tener lugar entre las diversas etapas de suministro de fluido. El ciclo de SBS puede repetirse  $n$  veces para extender el cebador 22 en  $n$  nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud  $n$ .

Aunque SBS se ha descrito en detalle, debe entenderse que las celdas de flujo descritas en el presente documento pueden utilizarse con otro protocolo de secuenciación, para genotipado, o en otras aplicaciones químicas y/o biológicas.

Para ilustrar más la presente divulgación, en el presente documento se

proporcionan ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la divulgación.

#### EJEMPLOS DE TRABAJO NO LIMITANTES

##### 5 ***Ejemplo 1***

Una mezcla de partículas de  $\text{Cu}_2\text{S}$  0,25 M y cebadores alquino-P5 y alquino-P7 10  $\mu\text{M}$  se preparó en un tampón de carbonato sódico 0,5 M a pH 10. Esta mezcla se dejó incubar a una temperatura de 60 °C durante un tiempo de aproximadamente 1 hora. Sin filtración, 10  $\mu\text{M}$  de la mezcla de injerto  
10 (denominada E1, y un ejemplo del primer ejemplo de la mezcla de injerto desvelada en el presente documento) se expuso a un carril/canal de sustrato estampado que incluye PAZAM en los pocillos del sustrato estampado.

Se prepararon tres mezclas de injerto comparativas. Como dos ejemplos comparativos, se prepararon mezclas de injerto de cebadores alquino-P5 y alquino-P7,  $\text{CuSO}_4$  (como catalizador), y  $N,N,N',N'',N''$ -  
15 Pentametildietilentriamina, con ascorbato (CE1) o sin ascorbato (CE2). Como tercer ejemplo comparativo (CE3), se preparó una mezcla de injerto de cebadores alquino-P5 y alquino-P7. En cada una de estas mezclas de injerto comparativas, el disolvente era un tampón de carbonato sódico 0,5 M. 10  $\mu\text{M}$  de  
20 cada una de las mezclas de injerto comparativas se expuso a sus respectivos carriles/canales de sustrato estampado que incluyen PAZAM en los pocillos del sustrato estampado.

Se realizó un ensayo CFR para comparar el injerto de los cebadores usando la mezcla de injerto con las sustancias catalíticamente activas  
25 desveladas en el presente documento (E1) y las mezclas de injerto comparativas

(CE1, CE2, CE3). Durante un ensayo CFR, las superficies injertadas con cebador se exponen a oligos complementarios marcados con fluorescencia (Cal Fluor Red) en una solución tampón. Estos oligos se unen a cebadores unidos a la superficie y el exceso de CFR se lava. Luego se escanea la superficie en un detector fluorescente para medir la intensidad de CFR en la superficie para proporcionar una medida cuantitativa de la concentración y el estado de los cebadores en la superficie. Después de la medición, los oligos se eliminan con una solución de base suave y las superficies se vuelven a escanear para confirmar que se eliminó todo el CFR.

La intensidad resulta, en términos de unidades de intensidad relativa, para la celda de flujo de ejemplo y las celdas de flujo comparativas se muestran en la Fig. 4. Las intensidades relativas oscilaron entre aproximadamente 0,182 y 0,209 para CE1 y entre 0,175 y 0,205 para el ejemplo de mezcla de injerto,  $\text{Cu}_2\text{S}$ , (E1). Como se representa, el ejemplo de mezcla de injerto E1, incluyendo las sustancias catalíticamente activas, fue tan eficaz en el injerto de cebador como mezcla de injerto comparativa CE1, que incluía el catalizador de cobre, el ligando estabilizador y el ascorbato. El ejemplo de la mezcla de injerto E1 también fue mucho más eficaz en el injerto de los cebadores que los ejemplos comparativos CE2 y CE3.

El ejemplo de celda de flujo E1 y el ejemplo comparativo de celda de flujo CE1 se usaron para secuenciar el genoma PhiX y se analizaron para determinar el porcentaje de grupos que pasan el filtro (%), nivel de calidad (Q30), la intensidad después de un ciclo de secuenciación, el porcentaje alineado, y la tasa de error (%). El % de filtro de paso (PF) es la métrica usada para describir los grupos que pasan un umbral de castidad y se utilizan para el procesamiento

y el análisis de los datos de secuenciación. Un mayor porcentaje de filtro de paso da como resultado un mayor rendimiento de pocillos no vacíos de calidad adecuada para secuenciar datos. El Q30, el porcentaje alineado y la tasa de error son métricas de calidad. Más particularmente, Q30 es equivalente a la probabilidad de una llamada base incorrecta 1 en 1000 veces. Esto significa que la precisión de la llamada base (es decir, la probabilidad de una llamada base correcta) es del 99,9 %. Una precisión de llamada de base inferior al 99 % (Q20) tendrá una probabilidad de llamada de base incorrecta en 1 de 100, lo que significa que cada lectura de secuencia de 100 pares de bases probablemente contendrá un error. Cuando la calidad de secuenciación alcanza Q30, prácticamente todas las lecturas serán perfectas, teniendo cero errores y ambigüedades. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

**TABLA 1**

| <b>Muestra</b> | <b>Grupos PF (%)</b> | <b>%&gt;= Q30</b> | <b>Alineado (%)</b> | <b>Tasa de Error (%)</b> | <b>Ciclo de Intensidad 1</b> |
|----------------|----------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|------------------------------|
| <b>Ejemplo</b> | 54,34 +/- 1,3        | 96,12             | 97,92 +/- 0,11      | 0,16 +/- 0,01            | 111 +/- 6                    |
| <b>CE1</b>     | 50,77 +/- 1,84       | 94,51             | 95,02 +/- 5,24      | 0,45 +/- 0,44            | 117 +/- 8                    |

Estos resultados indican que los cebadores injertados usando el primer ejemplo de la mezcla de injerto (E1) con la sustancia catalíticamente activa funcionan tan bien o mejor para la secuenciación.

Los resultados en este ejemplo son promedios sobre cuatro mosaicos de imágenes de los carriles/canales que fueron injertados y probados.

## **Ejemplo 2**

Mezclas de partículas de Cu<sub>2</sub>S 0,25 M y cebadores de alquino-P5 y

alquino-P7 10  $\mu\text{M}$  se prepararon en un tampón de carbonato sódico 0,5 M a pH 10. Se prepararon tres mezclas y se dejaron incubar a una temperatura de 60 °C durante diferentes periodos de tiempo, incluyendo 15 minutos, 30 minutos, y 60 minutos. Después de filtrar, 10  $\mu\text{M}$  de cada una de las mezclas de injerto (que son ejemplos del primer ejemplo de la mezcla de injerto desvelan en el presente documento) se expuso a un carril/canal de sustrato estampado que incluye PAZAM en los pocillos del sustrato estampado.

La intensidad resulta, en términos de unidades de intensidad relativa, frente al tiempo de incubación (o extracción) para las celdas de flujo de ejemplo se muestran en la Fig. 5. Las intensidades de fluorescencia relativas para estos ejemplos variaron de aproximadamente 0,036 a aproximadamente 0,152. Como se representa, la eficacia en el injerto de cebador aumentó con el aumento de los periodos de incubación. Esto indica que se formaron más sustancias catalíticamente activas cuando las mezclas se dejaron incubar durante más tiempo.

### ***Ejemplo 3***

Se prepararon diferentes mezclas para ilustrar que los ejemplos desvelados en el presente documento generan las sustancias catalíticamente activas. Una mezcla comparativa 1 incluía sulfuro de cobre (I) en agua, que no se filtró antes del ensayo. Otra mezcla comparativa 2 incluía sulfuro de cobre (I) en agua, que luego se filtró antes del ensayo. El ejemplo incluye partículas de  $\text{Cu}_2\text{S}$  y cebadores alquino-P5 y alquino-P7 en agua. Cada mezcla se dejó incubar a una temperatura de 60 °C durante un tiempo de aproximadamente 1 hora, que se filtró antes del ensayo.

La dispersión dinámica de la luz se realizó en cada una de las mezclas.

Los resultados son visibles en las Figs. 6A (mezcla comparativa 1), 6B (mezcla comparativa 2), y 6C (mezcla de ejemplo). Los resultados en la Fig. 6A indican que están presentes partículas de sulfuro de cobre (I) de tamaño micrométrico, y los resultados en la Fig. 6B indican que las partículas de sulfuro de cobre (I) de tamaño micrométrico se eliminaron durante el filtrado. Los resultados en la Fig. 6C indican que las sustancias catalíticamente activas estaban presentes después de realizar el filtrado.

#### *Notas adicionales*

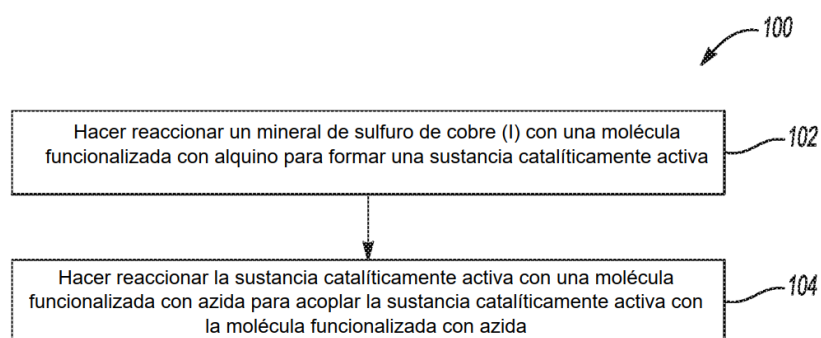
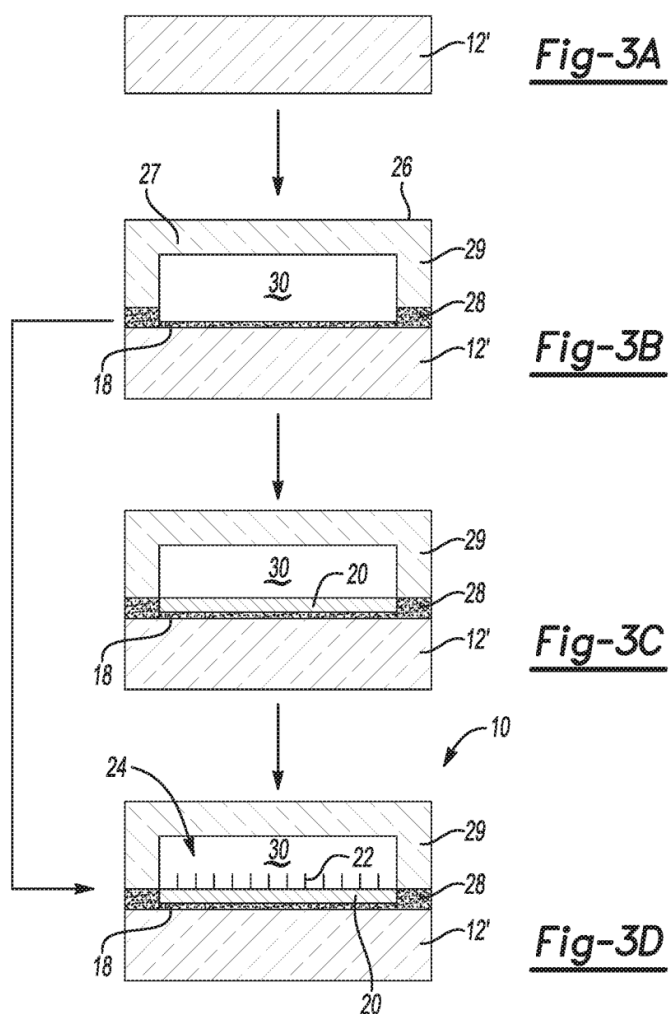
Debería apreciarse que todas las combinaciones de los conceptos anteriores y conceptos adicionales discutidos con mayor detalle a continuación (siempre que dichos conceptos no sean mutuamente inconsistentes) se contemplan como parte de la materia inventiva desvelará en el presente documento. En particular, todas las combinaciones de materias reivindicadas que aparecen al final de esta divulgación se contemplan como parte de la materia inventiva desvelará en el presente documento. También debería apreciarse que la terminología empleada explícitamente en el presente documento que también puede aparecer en cualquier divulgación incorporada por referencia debe tener el significado más coherente con los conceptos particulares desvelados en el presente documento.

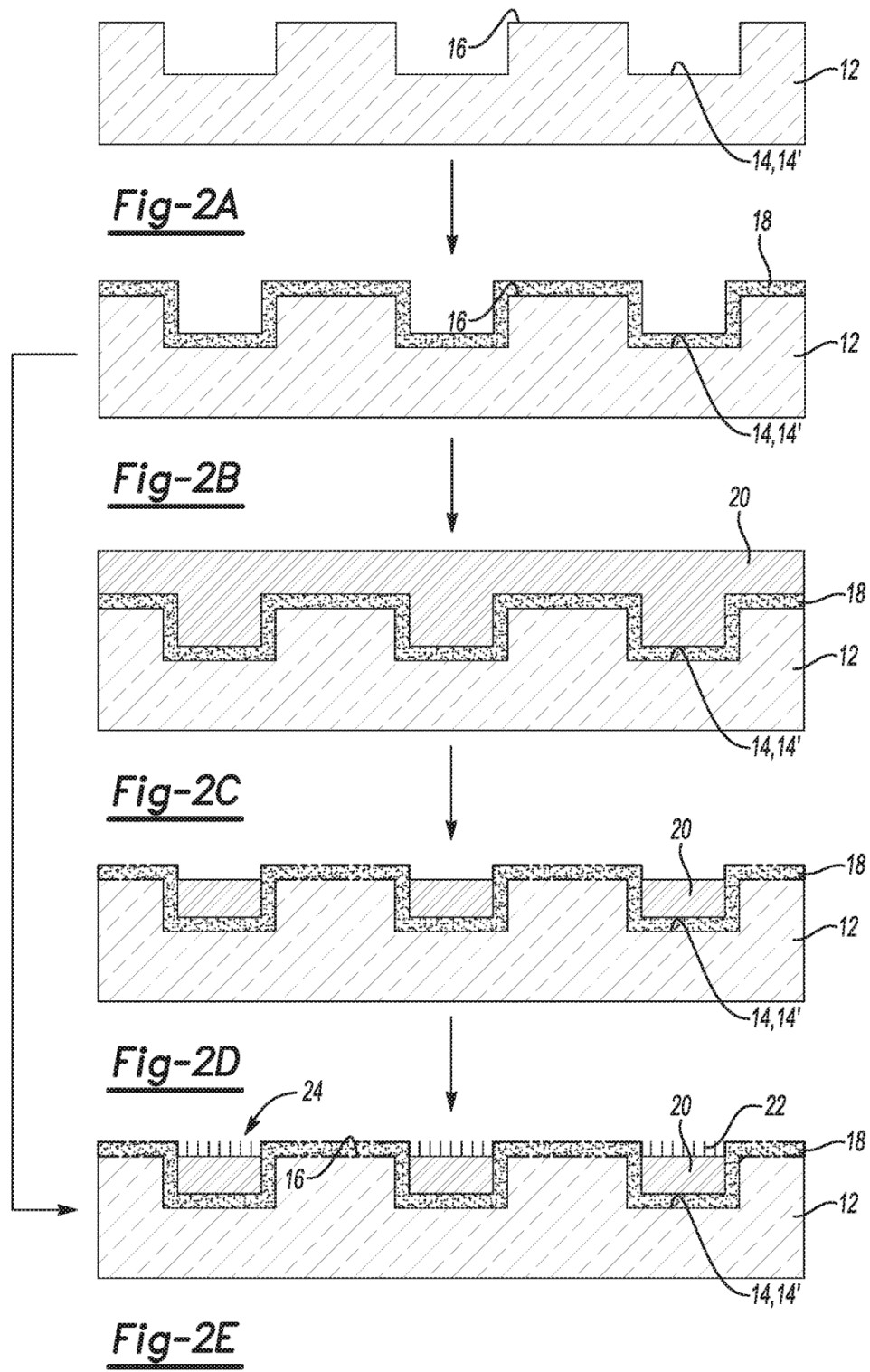
En toda la memoria descriptiva la referencia a "un ejemplo", "otro ejemplo", "un ejemplo", etc., significa que un elemento en particular (por ejemplo, características, estructura y/o característica) descrita en relación con el ejemplo se incluye en al menos un ejemplo descrito en el presente documento, y puede o no estar presente en otros ejemplos. Además, debe entenderse que los elementos descritos para cualquier ejemplo pueden combinarse de cualquier

manera adecuada en los diversos ejemplos a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Debe entenderse que los intervalos proporcionados en el presente documento incluyen el intervalo establecido y cualquier valor o subintervalo dentro del intervalo establecido. Por ejemplo, debería interpretarse que un intervalo de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 45  $\mu$ m, incluye no solo los límites explícitamente mencionados de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 45  $\mu$ m, sino que también incluye valores individuales, como aproximadamente 708 nm, aproximadamente 945 nm, aproximadamente 35  $\mu$ m, etc., y subintervalos, tal como de aproximadamente 825 nm a aproximadamente 29  $\mu$ m, de aproximadamente 950 nm a aproximadamente 40  $\mu$ m, etc. Además, cuando "aproximadamente" y/o "sustancialmente" se utilizan para describir un valor, están destinados a incluir variaciones menores (hasta +/- 10 %) del valor establecido.

Aunque se han descrito varios ejemplos en detalle, debe entenderse que los ejemplos desvelados pueden modificarse. Por lo tanto, la descripción anterior debe considerarse no limitante.

**Fig-1**



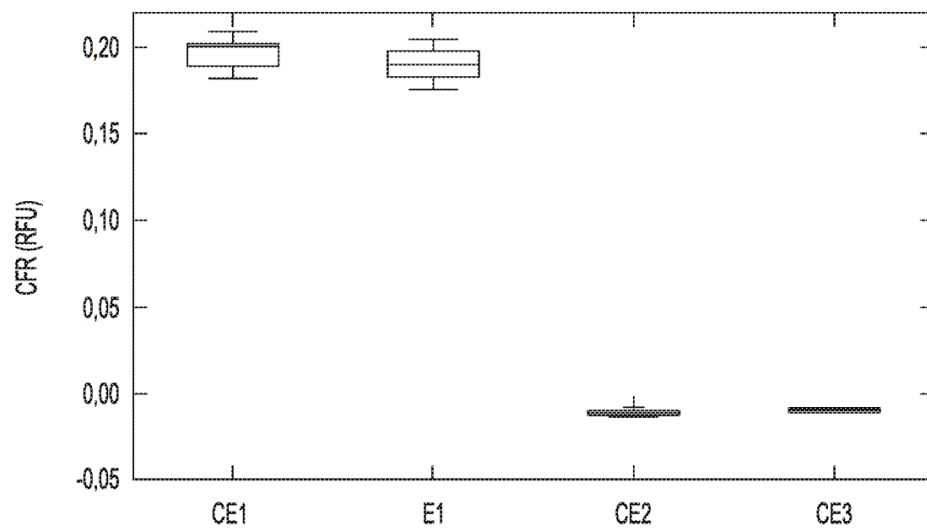


Fig-4

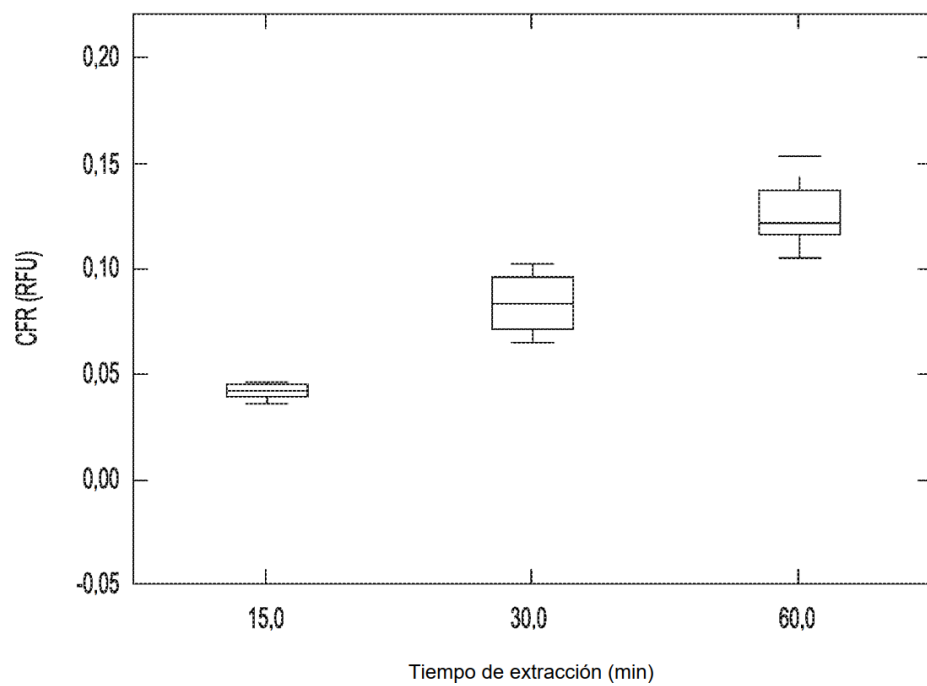


Fig-5

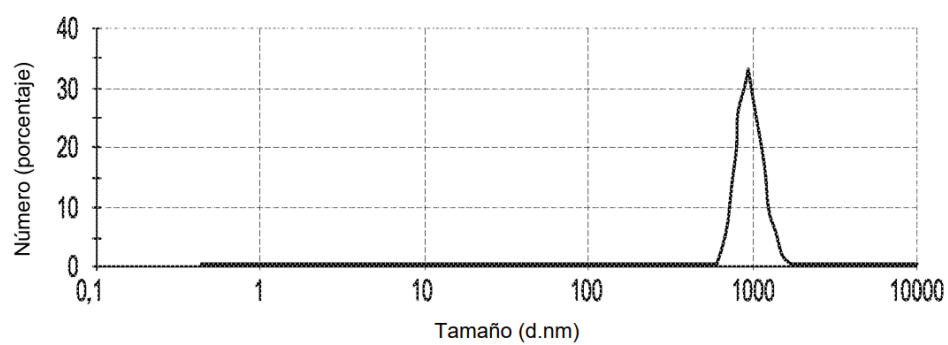


**Fig-6A**

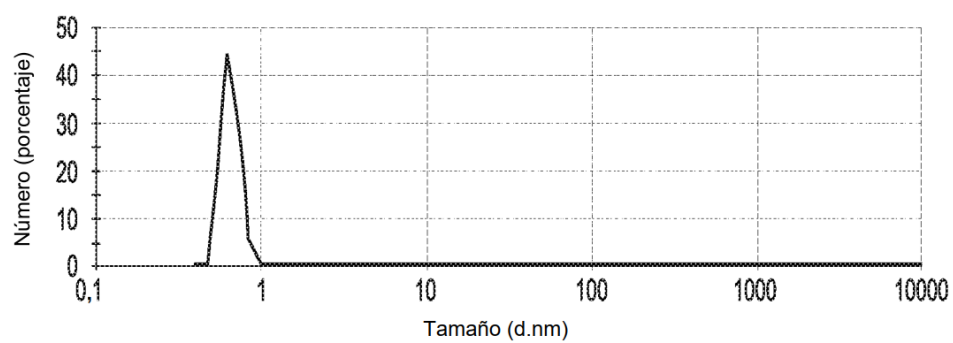


**Fig-6B**

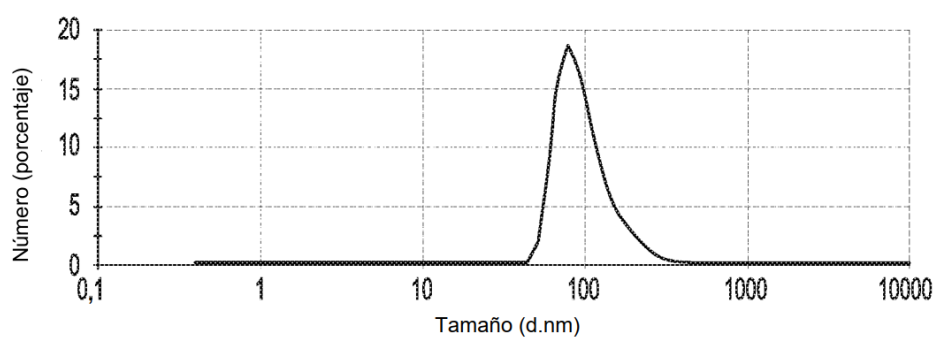


**Fig-6C**