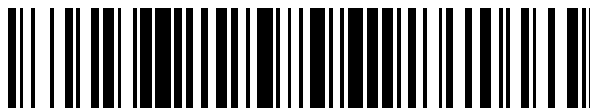


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 848**

21 Número de solicitud: 201930327

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 21/17 (2006.01)

G01N 29/02 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

10.04.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.10.2020

Fecha de concesión:

15.04.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

22.04.2021

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍN PÉREZ, Alberto;
RAMOS VEGA, Daniel;
CALLEJA GÓMEZ, Montserrat;
TAMAYO DE MIGUEL, Francisco Javier y
MALVAR VIDAL, Óscar**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Sistema de análisis mecano-óptico, método de fabricación del mismo, uso para identificación y clasificación de poblaciones celulares y procedimiento de análisis mecano-óptico**

57 Resumen:

Sistema de análisis mecano-óptico, método de fabricación del mismo, uso para identificación y clasificación de poblaciones celulares y procedimiento de análisis mecano-óptico.

Sistema de análisis que comprende: un sustrato reflectante; una estructura alargada hueca con dos extremos; dos soportes poliméricos, acoplados a los extremos y unidos al sustrato; un dispositivo piezoeléctrico, acoplado al sustrato y adaptado para producir vibraciones en la estructura alargada; un láser, para emitir un haz, un divisor de haz, un fotorreceptor, un módulo de amplificación, y un procesador, donde el haz láser atraviesa la cavidad, y es absorbido por el fotorreceptor, que genera una señal (S1) que transmite al módulo de amplificación, el cual la separa en componente modulada (AC), y no modulada (DC), y la transmite al procesador para obtener la frecuencia de resonancia y la reflectividad y para proporcionar al dispositivo piezoeléctrico, una señal de excitación (S2) a la frecuencia de resonancia.

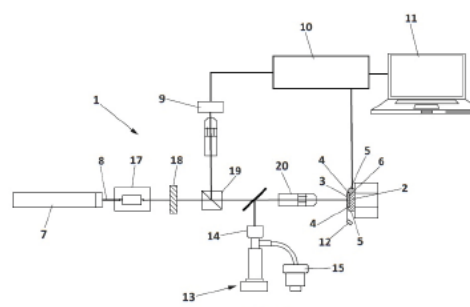


FIG. 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 786 848 B2

DESCRIPCIÓN

SISTEMA DE ANÁLISIS MECANO-ÓPTICO, MÉTODO DE FABRICACION DEL MISMO, USO PARA IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE POBLACIONES CELULARES Y PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS MECANO-ÓPTICO

OBJETO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un sistema de análisis de muestras de tipo mecánico y óptico, más en concreto, un sistema capaz de identificar partículas y/o células biológicas en suspensión acuosa o en medios fisiológicos.

El sistema de la invención permite la obtención de datos de tipo mecánico y óptico al mismo tiempo, y combinarlos de tal modo que sea posible realizar la distinción inequívoca de partículas, incluso si tienen la misma masa boyante.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La detección de partículas en líquido es de vital importancia hoy en día para numerosas aplicaciones, tanto en el campo de la salud como en medio ambiente o seguridad, por lo que existen diferentes métodos para detectarlas. Además de métodos basados en el filtrado y posterior análisis, algunos de estos métodos se basan en el uso de resonadores, que pueden utilizar elementos en voladizo que realizan medidas mecánicas al encontrarse en resonancia. El método de medida se basa en el cambio de frecuencia de resonancia del resonador debido al cambio de masa que experimenta cuando se añaden partículas en su superficie. Estos métodos permiten una alta precisión y una resolución adecuada para este tipo de aplicaciones. Siendo usados como sensores de masa en el laboratorio, se ha llegado incluso a alcanzar una resolución suficiente para realizar medidas de tamaños atómicos en ambientes controlados de ultra-alto vacío y baja temperatura.

Sin embargo, las mediciones se ven enormemente deterioradas cuando tratamos de aplicar estas técnicas de medida basadas en resonadores mecánicos en otro tipo de condiciones ambientales, es decir, no es posible tener condiciones de control estrictas, por ejemplo, en soluciones acuosas como ambientes fisiológicos para aplicaciones biológicas. Esto es debido a la interacción con el ambiente, donde el

rozamiento viscoso con un fluido que rodea el resonador amortigua el movimiento. Es por ello que se han desarrollado resonadores huecos que transportan el líquido en su interior, en lugar de estar rodeados por el mismo.

5 Este tipo de sistemas, pese a ser enormemente sensibles, presentan un problema
añadido: la medida de la masa en una muestra que se encuentra inmersa en un
líquido no es directa. El cambio de frecuencia del resonador, está influido por la
10 diferencia de la masa de la partícula y el volumen de líquido que desplaza, lo que se
conoce como masa boyante. Un método conocido para resolver esta limitación, es la
realización de mediciones usando varios líquidos portadores distintos con densidades
de masa conocidas. De este modo, es posible determinar la influencia de la densidad
15 del líquido portador en la toma de medidas, y diferenciar partículas con la misma masa
boyante. Esta diferenciación es necesaria, como la masa boyante de una partícula
depende de la densidad y el volumen de la misma, puede darse el caso de que dos
20 partículas con distinta densidad y volumen tengan la misma masa boyante y, por
tanto, den el mismo cambio de frecuencia de resonancia en el resonador. Sin
embargo, esto implica la realización de múltiples medidas con el fin de distinguir entre
distintas poblaciones de analitos, con el consecuente coste y con una alta
25 complejidad, que en muchos casos implica la imposibilidad de realizar estas
mediciones, pues en análisis biológicos el líquido portador muchas veces debe ser
uno determinado.

30 Otras propuestas se basan en la medida de otros parámetros de las partículas, como
su compresibilidad. Para ello, se mide la frecuencia de resonancia de modos
35 extensionales radiales del resonador, que tienen una mayor frecuencia y una menor
amplitud, y que sólo se pueden medir con el acoplamiento de modos ópticos
confinados en la superficie del resonador. Con el fin de excitar dichos modos ópticos,
40 a menudo se usa el campo evanescente de una fibra óptica que se aproxima a una
distancia de nanómetros de la superficie. Este proceso implica una gran complejidad
técnica, con un coste en elementos muy elevado para poder medir modos mecánicos
45 que son de por sí difíciles de medir.

50

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El sistema mecano-óptico de análisis de muestras de la invención permite la distinción inequívoca de partículas mediante la determinación de su masa boyante y de su reflectividad, el sistema comprendiendo:

- un sustrato reflectante;
- una estructura hueca alargada, que tiene dos extremos;
- dos soportes poliméricos, acoplados a los extremos de la estructura hueca y unidos al sustrato reflectante;
- al menos un dispositivo piezoeléctrico, acoplado al sustrato reflectante y en contacto con la estructura hueca, y adaptado para producir vibraciones en dicha estructura;
- al menos un láser, configurado para emitir un haz láser,
- al menos un fotorreceptor, adaptado para absorber el haz láser y producir una señal (S1) eléctrica asociada a la intensidad y frecuencia del haz láser recibido,
- al menos un módulo de amplificación, acoplado al dispositivo piezoeléctrico y al fotorreceptor, y configurado para amplificar y filtrar la señal (S1) eléctrica proporcionada por el fotorreceptor; y
- un procesador, acoplado al módulo de amplificación, y configurado para procesar la señal (S1) eléctrica amplificada y filtrada con el fin de proporcionar una medida de la frecuencia de resonancia de la cavidad en cada instante de tiempo, la cual varía en función de la variación de la masa boyante de la muestra;

donde el haz láser atraviesa la cavidad antes de alcanzar el fotorreceptor, el fotorreceptor genera una señal (S1) que transmite al módulo de amplificación, estando dicho módulo de amplificación adaptado para separar la componente modulada (AC), y no modulada (DC) de la señal (S1), y el procesador está configurado para obtener una medida de la frecuencia de resonancia en cada instante de tiempo, a partir de la componente modulada (AC) de la señal (S1), y la reflectividad en el interior de la estructura hueca en cada instante de tiempo, a partir de la componente no modulada (DC) de la señal (S1) y para proporcionar al dispositivo piezoeléctrico, a través del módulo de amplificación, una señal de excitación (S2) a la frecuencia de resonancia, con el fin de que dicho dispositivo piezoeléctrico produzca vibraciones en la cavidad a la frecuencia de resonancia en cada instante de tiempo.

El uso de métodos de medida ópticos permite una correcta determinación de la masa boyante de las partículas de la muestra, proporcionando un parámetro de diferenciación entre partículas. De ese modo, es posible distinguir entre partículas con la misma masa boyante pero que realmente son diferentes.

5

Dos partículas con distinta densidad y distinto volumen pueden tener la misma masa boyante, por lo que, el uso de un haz de láser y un fotorreceptor para obtener una medida de la reflectividad de las partículas que circulan a través de la cavidad, permite distinguir entre estas partículas en tiempo real, proporcionando medidas de su masa boyante y de la luz dispersada, realizando un análisis fiable y reduciendo costes asociados a la realización de más medidas con el fin de diferenciar estas partículas.

10

Estas ventajas se deben a la adquisición simultánea de la masa boyante y la reflectividad de cada partícula al pasar a través de la estructura hueca, por lo que, incluso si se realizaran la medida de masa boyante y reflectividad en procesos consecutivos, pero no simultáneos, no se conseguiría el objetivo deseado, ya que la medida obtenida sería una media de la masa boyante de la muestra y una media de la reflectividad de la muestra, impidiendo así la diferenciación entre las partículas que conforman dicha muestra.

15

El sistema de análisis de la invención, puede además comprender elementos ópticos que permitan un mejor desempeño, entre los que se pueden encontrar un aislador óptico, para evitar que el haz láser pueda retornar hacia el interior del propio láser, causando un mal funcionamiento del mismo.

20

Adicionalmente, el sistema puede comprender un filtro de densidad neutra para permitir el paso de luz a una intensidad determinada y un divisor de haces no polarizado, destinado a dividir el haz de luz y desviar parte del mismo en una dirección determinada, más específicamente, el divisor de haces puede estar colocado a 45°, de modo que el mismo desvíe parte del haz en dirección perpendicular al haz original.

25

Preferentemente, el amplificador es de tipo sincrónico, lo que permite extraer la señal (S1) incluso en presencia de elevado ruido en la señal.

30

Además, de forma preferente, la señal de excitación (S2), que se envía al dispositivo piezoeléctrico, es una señal sinusoidal a la frecuencia de resonancia.

35

El dispositivo piezoeléctrico del sistema puede ser de cerámica, que proporciona una mayor flexibilidad en geometría y dimensiones y unas propiedades mejoradas con respecto a otros cristales piezoeléctricos.

5 Preferentemente, la estructura alargada hueca es de sílice fundida y tiene un diámetro de aproximadamente 50µm, pero pudiendo llegar hasta 1µm de diámetro. El uso de
10 sílice fundida, que es un material transparente, permite el paso del haz laser a su través, con el fin de que dicho haz atraviese la muestra y alcance el fotorreceptor. El diámetro reducido de la cavidad además hace que el flujo de partículas sea ordenado y no aleatorio.

15 El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, donde los soportes poliméricos son de fotorresina SU8, permitiendo un mejor control de su adherencia a los extremos de la cavidad.

20 El láser que se usa para producir el haz puede ser de tipo Helio-Neón, por ser uno de los más comunes y fácilmente accesibles.

25 Preferiblemente, el sistema también comprende una cámara con un objetivo infinito que tiene un sensor con células fotoeléctricas, una fuente de luz blanca y un monitor, que permite ver el interior de la cavidad.

30 La cámara permite comprobar si el láser está correctamente colocado para apuntar de forma precisa al centro de la estructura hueca alargada y, además, que no se produce ningún atasco en el interior de la cavidad.

35 El sistema puede además comprender una bomba destinada a controlar el flujo del líquido en el interior de la estructura hueca. La bomba del sistema puede ser una bomba de jeringas, o preferiblemente, puede ser una bomba de gas a presión, y más específicamente, una bomba de dióxido de carbono y/o nitrógeno a presión,
40 configurada para controlar el flujo en el interior de la estructura hueca alargada, a la vez que evita la aparición de ruido en la medida de la frecuencia de resonancia realizada por el sistema. Así, la bomba permite proporcionar un flujo constante, sin variaciones bruscas abruptas que puedan afectar a dicha medida.

50

La invención también se refiere a un método de fabricación de la cavidad alargada hueca suspendida sobre el sustrato reflectante, que comprende los pasos de:

- 5 - proveer una estructura alargada hueca, con dos extremos, que tiene una capa protectora de poliimida,
- eliminar la capa protectora en la zona central de la estructura hueca alargada, calentando dicha zona,
- 10 - aplicar una tensión axial a la estructura alargada sin capa protectora, para deformar plásticamente su zona central, hasta conseguir un diámetro determinado,
- 15 - adherir dos o más soportes (5) poliméricos, fabricados sobre un sustrato (2) reflectante, en cada uno de los extremos (4) de la estructura hueca (3) deformada, quedando la estructura (3) suspendida sobre el sustrato reflectante mediante los soportes (5) poliméricos.

20 El método de fabricación propuesto permite un control efectivo del diámetro de la estructura hueca alargada resultante, el cual determina la capacidad del sistema para permitir un flujo ordenado de partículas sin impedir el paso de las partículas que se pretende analizar, y la longitud suspendida, lo que controla la frecuencia de resonancia mecánica de la estructura.

30 Preferentemente, el paso de adherir soportes poliméricos en cada uno de los extremos de la cavidad se realiza mediante un recubrimiento centrífugo y usando litografía óptica, que aplica un patrón definido de polímero en a los extremos de la
35 estructura hueca alargada.

40 La litografía óptica es una técnica extendida, barata y sencilla, pues permite realizar un recubrimiento centrífugo y dibujar un patrón, dejando parte de la estructura hueca embebida dentro del material sólido del recubrimiento a la vez que otras partes quedan libres de dicho recubrimiento. Este método permite alcanzar una elevada
45 resolución y velocidad en la realización del recubrimiento, a la vez que evita limitarse a estructuras de muy bajo espesor.

50 La invención también se refiere al uso del sistema de análisis de la invención para la identificación y clasificación de distintas poblaciones celulares presentes en una muestra biológica aislada. Es decir, de acuerdo a esta aplicación, el sistema descrito

permite detectar la existencia y diferenciar al menos dos líneas o poblaciones celulares distintas en la muestra biológica analizada y clasificar dichas células.

Preferiblemente, este aspecto de la invención se refiere a la identificación y clasificación de células tumorales y células no tumorales. El sistema permite, por tanto, detectar la presencia de distintas poblaciones celulares en una misma muestra analizada y clasificar dichas células como tumorales o no tumorales, lo que posibilita su aplicación en clínica, por ejemplo, para el diagnóstico *in vitro* de tumores, preferiblemente de cáncer, a partir de muestras biológicas aisladas del paciente. Más preferiblemente, las células son células epiteliales, aún más preferiblemente procedentes de tejido mamario.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Muestra una vista esquemática de una realización preferente del sistema de la invención.

Figura 2.- Muestra una vista esquemática del proceso de fabricación del sistema de la invención.

Figura 3.- Muestra un gráfico que compara la medida de la masa boyante obtenida para dos partículas diferentes, mediante el sistema de la invención.

Figura 4.- Muestra un gráfico que compara la medida de la reflectividad obtenida para las dos partículas de la Figura 3, mediante el sistema de la invención.

Figura 5.- Muestra un gráfico que combina las medidas de la masa boyante y la reflectividad obtenidas para las dos partículas de la Figura 3, mediante el sistema de la invención.

Figura 6.- Muestra un gráfico que compara la medida de la variación de la frecuencia de resonancia y la reflectividad obtenida cuando la cavidad es atravesada por una partícula, dos partículas y una partícula y un dímero, respectivamente, mediante el sistema de la invención.

5 REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

10 El sistema (1) mecano-óptico de análisis de muestras de la invención permite la distinción inequívoca de partículas mediante la determinación simultánea de su masa boyante y de su reflectividad. Para ello se mide interferométricamente el modo fundamental de vibración de una estructura alargada (3), a la que llamaremos capilar, transparente y hueco mientras fluye líquido en su interior. El modo fundamental de
15 vibración, en contraposición con los modos radiales extensionales, tiene una frecuencia de resonancia más baja, y una menor rigidez, por tanto, una mayor amplitud. La medida mediante dicho modo fundamental permite realizar la medida
20 óptica interferométrica, sin necesidad de excitar modos ópticos.

25 Por el contrario, para la realización de la medida óptica, el sistema (1) de la invención utiliza un patrón de interferencia generado con un sustrato (2) reflectante para medir la oscilación del modo fundamental de vibración. El uso de un capilar (3) transparente permite medir la luz dispersada por las partículas fluyendo en su interior, lo que nos permite medir su reflectividad y así, a partir de dos parámetros medidos
30 simultáneamente, la frecuencia de resonancia y la reflectividad, diferenciar entre partículas con la misma masa boyante.

35 La Figura 1 muestra una vista completa de una realización preferente del sistema (1) de la invención, capaz de combinar medidas ópticas y mecánicas con el fin de obtener una correcta determinación de partículas en suspensión acuosa o células en un medio fisiológico.
40

45 La realización de las medidas mecánicas se realiza mediante una estructura alargada (3) hueca resonante dispuesta en forma de canal suspendido con el líquido que contiene las muestras a analizar fluyendo en su interior.

50 La Figura 2 muestra el proceso de fabricación de la estructura alargada (3) hueca resonante de sílice fundida, donde el proceso comprende los siguientes pasos:

- Se hace uso de un capilar, una estructura (3) hueca y alargada de diámetro reducido, que cuenta con dos extremos (4) y que tiene una capa protectora (16) de poliimida que le confiere flexibilidad y robustez. El capilar (3) está hecho de sílice fundida, pues es necesario que sea transparente.
- 5 - Se elimina la capa protectora en la zona central del capilar (3), calentando el capilar (3), mediante el uso de una llama controlada, que piroliza dicha capa (16) protectora y deja descubierto el capilar (3).
- 10 - Se aplica una tensión axial al capilar (5), mientras se calienta el mismo, y de este modo se produce una deformación plástica en su zona central, que hace el capilar (3) más alargado y reduce progresivamente el diámetro de dicho capilar (3) hasta conseguir un diámetro de 50µm.
- 15 - Se coloca el capilar (3) sobre un sustrato (2) reflectante, donde se vierte resina líquida que cubre tanto el capilar (3) como el sustrato (2).
- 20 - Se usa una máscara para exponer a luz ultravioleta la resina sobre los extremos (4) del capilar (3)
- 25 - Se introduce el conjunto sólido, capilar (3) y sustrato (2), en un disolvente que disuelve las partes de la resina que no han sido expuestas a luz ultravioleta, quedando dos soportes (5) poliméricos sobre los que queda suspendido el capilar (3).

30 El capilar (3) una vez en su posición permite el flujo de la muestra sobre un líquido portador a través del canal. El flujo presenta una disposición de partículas prácticamente lineal, en la que las partículas se colocan una detrás de otra debido al reducido diámetro del capilar (3).

35 El control del flujo en el interior del capilar (3) se realiza con una bomba (12) de nitrógeno a presión que permite obtener un flujo continuo, libre de pulsaciones aleatorias, y fija el rango de presiones de 10mbar hasta 7bar, tal y como se aprecia en
40 la Figura 1.

45 El capilar (3) por encontrarse en suspensión define una serie de modos mecánicos propios, que presentan unas frecuencias de resonancia determinadas. Los modos propios del capilar (3) dependen, entre otras cosas de la longitud del capilar (3) suspendido, determinado durante el proceso de litografía óptica.

50

La frecuencia de resonancia del capilar (3), sin embargo, variará en función de la masa de la muestra junto con la masa del líquido portador.

La Figura 1, muestra también una cerámica piezoeléctrica (6) que se encarga de producir vibraciones en el capilar (3) suspendido. Un cristal piezoeléctrico (6) es un elemento que es capaz de convertir las tensiones que se le aplican en una diferencia de potencial que origina una señal eléctrica, y de la misma manera, se deforma bajo la aplicación de una carga eléctrica. Este funcionamiento permite que la cerámica piezoeléctrica (6) ejerza una vibración determinada en el capilar (3), controlada por la señal eléctrica que se le proporciona.

La señal de excitación (S2) de la cerámica piezoeléctrica (6) viene determinada por un amplificador (10) sincrónico que recibe la señal que se pretende aplicar al capilar (3) de un procesador (11). La señal aplicada en este caso será una señal sinusoidal igual a la frecuencia de resonancia fundamental, la más baja, con una amplitud de 1.5V. Alternativamente, se podría usar un modo propio superior para producir la resonancia con otra frecuencia más alta.

El sistema (1) además comprende una segunda fuente de medidas de tipo óptico, mostrada en la Figura 1. El sistema (1) comprende un láser (7) de tipo Helio-Neón que emite un haz (8) de luz, el haz (8) de luz pasa por un aislador óptico (17), que evita que un haz (8) reflejado pueda alcanzar el láser (7) y causar un malfuncionamiento, y entonces, pasa por un filtro de densidad neutra (18) que permite regular la intensidad del haz (8) del láser (7). El haz (8) del láser (7) filtrado entonces pasa por un divisor de haces (19) no polarizado, que genera dos haces, uno de los haces (8) pasa a través del objetivo (20) hacia el capilar (3). El haz (8) de luz atraviesa el capilar (3), se refleja en el sustrato (2) y vuelve a atravesar el capilar (3) y el objetivo (20) hasta alcanzar el divisor de haces (19), el cual lo desvía hacia un fotorreceptor (9) que recoge el haz (8) modificado debido al paso a través del capilar (3) y genera una señal (S1) asociada a las propiedades del haz (8) recogido.

El fotorreceptor (9) entrega la señal (S1) generada al amplificador (10) síncrono, que se encarga de dividir la componente modulada (AC) de la señal y la componente no modulada (DC).

La componente modulada (AC), permite obtener la densidad espectral de potencia en función de la frecuencia, de modo que es posible calcular la frecuencia de resonancia, mediante una técnica óptica, en cada instante de tiempo.

5 Con estos datos se hace una medida de la masa boyante con una configuración en
lazo cerrado (PLL), en el que el sistema se retroalimenta y calcula la frecuencia de
resonancia, en cada instante de tiempo, adaptando, dentro de unos márgenes
10 previamente fijados, la frecuencia de la señal (S2) de excitación de la cerámica
piezoeléctrica (6), la cual coincide con la frecuencia de demodulación, a la frecuencia
de resonancia en el instante previo, de modo que se mantenga fija la fase de la señal
15 (S1) que envía el fotorreceptor (9). En cada instante de tiempo, el flujo de partículas
en el interior del capilar (3) hace que se varíe la frecuencia de resonancia, por lo que
se vuelve a calcular la frecuencia de resonancia de forma continua. La configuración
PLL es muy útil cuando se quieren medir cambios en la frecuencia de resonancia
20 mayores a 1kHz y/o que ocurran en tiempos del orden de un segundo.

El procesador (11) recibe, por tanto, la señal modulada (AC) en forma de espectro de
25 oscilación, a partir del cual, es capaz de determinar la frecuencia de resonancia, que
ha cambiado con respecto a la inicial, debido al movimiento del líquido portador en el
interior del capilar (3) y del flujo de partículas a través de dicho capilar (3). De ese
modo, es posible determinar la frecuencia de resonancia del capilar (3) en cada
30 instante de tiempo.

Alternativamente, se puede realizar el cálculo de la frecuencia de resonancia con una
35 configuración en lazo abierto, donde la frecuencia de la señal (S2) que se envía a la
cerámica piezoeléctrica (6) es fija, de modo que mediante el amplificador (10)
sincrónico se mide el cambio de fase de la señal (S1) que proporciona el fotorreceptor
(9), entre el capilar (3) vacío y el capilar (3) con una partícula en su interior, con una
40 frecuencia de muestreo de hasta 2kHz y con una frecuencia de demodulación igual a
la frecuencia de resonancia del capilar (3).

45 Teniendo en cuenta que la curva de fase en función de la frecuencia presenta una
zona lineal para frecuencias similares a la frecuencia de resonancia, se puede
convertir la medida del cambio de fase de la señal (S1) en cada instante de tiempo en
50 una medida de cambio de frecuencia en cada instante de tiempo, a partir de la cual
obtener la frecuencia de resonancia en cada instante de tiempo.

La configuración de lazo abierto es muy útil cuando se quieren medir cambios en la frecuencia de resonancia pequeños que ocurren en tiempos del orden de los 100ms, siendo esta configuración, en ese rango de funcionamiento, más rápida y eliminando además problemas de ruido.

5

A continuación, mediante un proceso de calibración se puede hacer un ajuste lineal de una curva que representa el cambio de la frecuencia de resonancia en función de la variación de la masa del capilar (3). De ese modo, se puede calcular la masa boyante de la muestra que fluye en el interior del capilar (3) en base a las variaciones en la frecuencia de resonancia, calculada mediante la configuración en lazo cerrado o, preferiblemente, la configuración en lazo abierto.

10

15

Por otro lado, la componente no modulada de la señal, aporta información, en este caso de la reflectividad de la muestra que fluye en el interior del capilar (3). En cada instante de tiempo, el paso de las partículas de la muestra modifica la intensidad del haz reflejado dejando una señal que muestra la dimensión e índice de refracción de las partículas.

20

25

De ese modo, el sistema (1) permite la medida de la masa boyante y de la dispersión de luz que produce una muestra determinada, de modo que ambas medidas posibilitan la diferenciación inequívoca de partículas diferentes, con distinta densidad y volumen, aunque tengan la misma masa boyante.

30

El sistema (1) de la invención además conserva su alta precisión ante cambios en la densidad del líquido portador y del índice de refracción del mismo.

35

Adicionalmente, el sistema (1) puede ser usado para la medida de partículas en suspensión acuosa, por ejemplo, para el análisis de agentes contaminantes, o células en un medio fisiológico, para el diagnóstico de enfermedades.

40

La Figura 1 también muestra una cámara (13) con un objetivo infinito que permite ver en tiempo real los cambios que se producen en el interior del capilar (3). De este modo, se puede controlar de forma más efectiva el paso de partículas a través del canal del capilar (3), y asegurar que el láser está bien direccionado.

45

50

La cámara (3) comprende un sensor (14) con células fotoeléctricas conocido como dispositivo de carga acoplada (CCD) y una fuente de luz blanca (15).

La Figura 3 muestra un ejemplo de las medidas de masa boyante realizadas en partículas de polimetilmetacrilato (PMMA) de $12.5\mu\text{m}$ y partículas de sílice de $8.5\mu\text{m}$. Donde el eje vertical representa la cantidad de partículas de un mismo tipo en porcentaje y el horizontal, la masa boyante. La masa boyante de ambos tipos de partículas es muy similar lo que hace prácticamente imposible distinguir con esta medida la presencia de dos tipos de partículas diferentes.

La Figura 4 muestra un ejemplo de las medidas realizadas de la reflectividad de las partículas de PMMA y de sílice, analizadas en la Figura 4. Donde el eje vertical representa la cantidad de partículas de un mismo tipo en porcentaje y el horizontal, la reflectividad normalizada. La reflectividad de ambas partículas es muy diferente permitiendo distinguir claramente entre ambos tipos de partículas.

La Figura 5 muestra un mapa que representa la masa boyante frente al cambio en reflectividad normalizado. Este gráfico combina los datos mecánicos y ópticos obtenidos por el sistema (1) de la invención. A diferencia del gráfico de la Figura 3, el cual es el que típicamente se obtiene de un dispositivo de análisis mecánico como los encontrados en el estado de la técnica, en este nuevo gráfico se puede hacer una distinción clara de distintos tipos de partículas, como son las de PMMA y de sílice con diferentes tamaños, pero que tienen una masa boyante muy similar y difícilmente diferenciable sin el aporte de medidas ópticas.

La Figura 6 además muestra un gráfico que representa la capacidad del sistema (1) para distinguir entre las medidas de una partícula y varias de ellas, cuando pasan a la vez por el capilar. Donde el eje vertical representa el cambio en reflectividad normalizado, en el caso de las medidas ópticas, y la variación de frecuencia de resonancia, en el caso de las medidas mecánicas, y el eje horizontal representa el tiempo. Podría darse el caso que dos partículas pasen muy juntas por el capilar, de modo que ambas se encuentran en la zona suspendida al mismo tiempo. Esto modifica de forma notable los resultados, pues la medida de masa boyante ya no es de una, sino de dos partículas. Para evitar confundir esta medida con la medida de una sola partícula de masa boyante mayor, se puede hacer uso de las medidas ópticas.

Debido a que la medida de parámetros ópticos se realiza solo en la zona en la que incide el haz (8) del láser (7), mientras que las medidas mecánicas están afectadas por partículas que se encuentren en cualquier punto de la longitud del capilar (3) suspendido, la señal óptica tiene una duración temporal menor que la señal mecánica.

5 Esto permite, como se muestra en la Figura 6, usar las medidas ópticas para determinar el número de partículas que pasan a través del capilar (3) al mismo tiempo.

10 En una realización particular, las medidas ópticas son sensibles en una región coincidente con el tamaño del haz láser, en este caso de unos $20\mu\text{m}$, mientras que las medidas mecánicas son sensibles en una región de $500\mu\text{m}$. La señal de la reflectividad nos permite saber si un evento medido en la señal de la frecuencia de resonancia se debe a una o varias partículas y, en el caso de que se trate de varias partículas, separar la contribución de cada una de ellas a la medida del cambio de la frecuencia de resonancia. Si dos partículas pasan a la vez por el capilar separadas
15 una distancia menor que $20\mu\text{m}$ no serán distinguibles en la señal de la reflectividad y, en tal caso, se tratará de un dímero.

25 El sistema de análisis mostrado, también es capaz de clasificar y diferenciar de forma unívoca líneas celulares. Por ejemplo, en el caso de las líneas celulares MCF-10A, sanas, y MCF-7, cancerosas, tienen una masa boyante media muy similar, en concreto 110 pg con una desviación estándar de 40 pg y 90 pg con una desviación
30 estándar de 60 pg , respectivamente, de modo que son indistinguibles mediante el uso de únicamente medidas derivadas de la frecuencia de resonancia. Sin embargo, mediante la adquisición simultánea de la masa boyante y la reflectividad de cada
35 partícula medida mediante el sistema de la invención, se pueden distinguir de forma inequívoca las células de ambas líneas celulares.

40

REIVINDICACIONES

1. Un sistema (1) de análisis de muestras caracterizado porque comprende:

- 5 - un sustrato (2);
- una estructura (3) alargada hueca, que tiene dos extremos (4);
- dos soportes (5) poliméricos, acoplados a los extremos (4) de la estructura hueca alargada (3) y unidos al sustrato (2);
- 10 - al menos un dispositivo piezoeléctrico (6), acoplado al sustrato (2) y en contacto con la estructura hueca alargada (3), y adaptado para producir vibraciones en dicha cavidad (3);
- 15 - al menos un láser (7), configurado para emitir un haz (8) láser,
- al menos un fotorreceptor (9), adaptado para absorber el haz (8) láser, que atraviesa la cavidad (3) antes de alcanzar el fotorreceptor (9), y producir
- 20 una señal (S1) eléctrica asociada a la intensidad y frecuencia de modulación del haz (8) láser recibido,
- al menos un módulo de amplificación (10), acoplado al dispositivo piezoeléctrico (6) y al fotorreceptor (9), y configurado para amplificar y filtrar
- 25 la señal (S1) eléctrica proporcionada por el fotorreceptor (9), y para para separar la componente modulada (AC), y no modulada (DC) de la señal (S1); y
- 30 - un procesador (11), acoplado al módulo de amplificación (10), y configurado para procesar la señal (S1) eléctrica amplificada y filtrada y obtener, a partir de la componente modulada (AC) de la señal (S1), una
- 35 medida de la frecuencia de resonancia de la cavidad (3) en cada instante de tiempo, la cual varía en función de la variación de la masa boyante de la muestra, y a partir de la componente no modulada (DC) de la señal (S1) la
- 40 reflectividad en el interior de la cavidad (3) en cada instante de tiempo;

donde el procesador está además configurado para proporcionar al dispositivo piezoeléctrico (6), a través del módulo de amplificación (10), una señal de

45 excitación (S2) a la frecuencia de resonancia, para que dicho dispositivo piezoeléctrico (6) produzca vibraciones en la cavidad (3) a la frecuencia de resonancia en cada instante de tiempo.

50

2. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el amplificador (10) es de tipo sincrónico.
- 5 3. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la señal de excitación (S2), que se envía al dispositivo piezoeléctrico (6), es una señal sinusoidal a la frecuencia de resonancia.
- 10 4. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el dispositivo piezoeléctrico (6) es de cerámica.
- 15 5. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la estructura (3) alargada hueca es de sílice fundida.
- 20 6. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el diámetro final de la estructura hueca (3) alargada es de aproximadamente 50µm.
- 25 7. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque los soportes (5) poliméricos son de fotorresina SU8.
- 30 8. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el láser (7) usado es de tipo Helio-Neón o un láser de diodo.
- 35 9. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende una bomba (12), configurada para controlar el flujo en el interior de la estructura hueca alargada (1).
- 40 10. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende una cámara (13) con un objetivo infinito que tiene un sensor (14) con células fotoeléctricas, una fuente de luz blanca (15) y un monitor, que permite ver el interior de la cavidad (3).
- 45 11. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende al menos un divisor de haz (20).
- 50 12. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende al menos un filtro (19) de densidad neutra.

13. El sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende al menos un aislador (18) óptico.
14. Método de fabricación de una estructura (3) alargada hueca, caracterizado porque comprende los pasos de:
- proveer una estructura (3) alargada hueca, con dos extremos (4), que tiene una capa protectora (16),
 - eliminar la capa protectora (16) en la zona central de la estructura hueca alargada (3), calentando dicha zona (3),
 - aplicar una tensión axial a la estructura hueca alargada (3) calentada, para deformar plásticamente su zona central, hasta conseguir un diámetro determinado,
 - adherir dos o más soportes (5) poliméricos, fabricados sobre un sustrato (2) reflectante, en cada uno de los extremos (4) de la estructura hueca (3) deformada, quedando la estructura (3) suspendida sobre el sustrato reflectante mediante los soportes (5) poliméricos.
15. Método de fabricación de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque el paso de adherir soportes (5) poliméricos en cada uno de los extremos de la cavidad (3) se realiza mediante un recubrimiento centrífugo y usando litografía óptica, que aplica un patrón definido de polímero en la cavidad (3).
16. Procedimiento de análisis de muestras caracterizado porque comprende los pasos de:
- proveer un sistema (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13;
 - accionar el láser (7), que emite un haz (8) láser, el cual incide en la estructura (3) hueca que contiene la muestra y es recogido en el fotorreceptor (9);
 - generar una señal (S1), mediante el fotorreceptor (9);
 - amplificar y filtrar la señal (S1) generada, mediante el módulo de amplificación (10);

- dividir la señal (S1) amplificada y filtrada, por medio del módulo de amplificación (10), en una componente modulada (AC) y una componente no modulada (DC);
 - 5 - procesar la componente modulada (AC) de la señal (S1), mediante un procesador para obtener una medida de la frecuencia de resonancia de la cavidad (3) en un instante de tiempo;
 - 10 - calcular a partir de la frecuencia de resonancia medida un valor de masa boyante en un instante de tiempo;
 - procesar la componente no modulada (DC) de la señal (S1), mediante un procesador para obtener una medida de la reflectividad de la muestra en el interior de la cavidad (3) en un instante de tiempo;
 - 15 - generar una señal de excitación (S2) a la frecuencia de resonancia calculada, por medio del procesador; y
 - transmitir la señal de excitación (S2) generada al dispositivo piezoeléctrico por medio del módulo de amplificación (10).
 - 20
17. Uso del sistema de análisis de acuerdo con la reivindicación 1 para la
- 25 identificación y clasificación de distintas poblaciones celulares presentes en una muestra biológica aislada.
18. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, para la identificación y clasificación
- 30 de células tumorales y células no tumorales.
19. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, donde las
- 35 células son células epiteliales de tejido mamario.
- 40

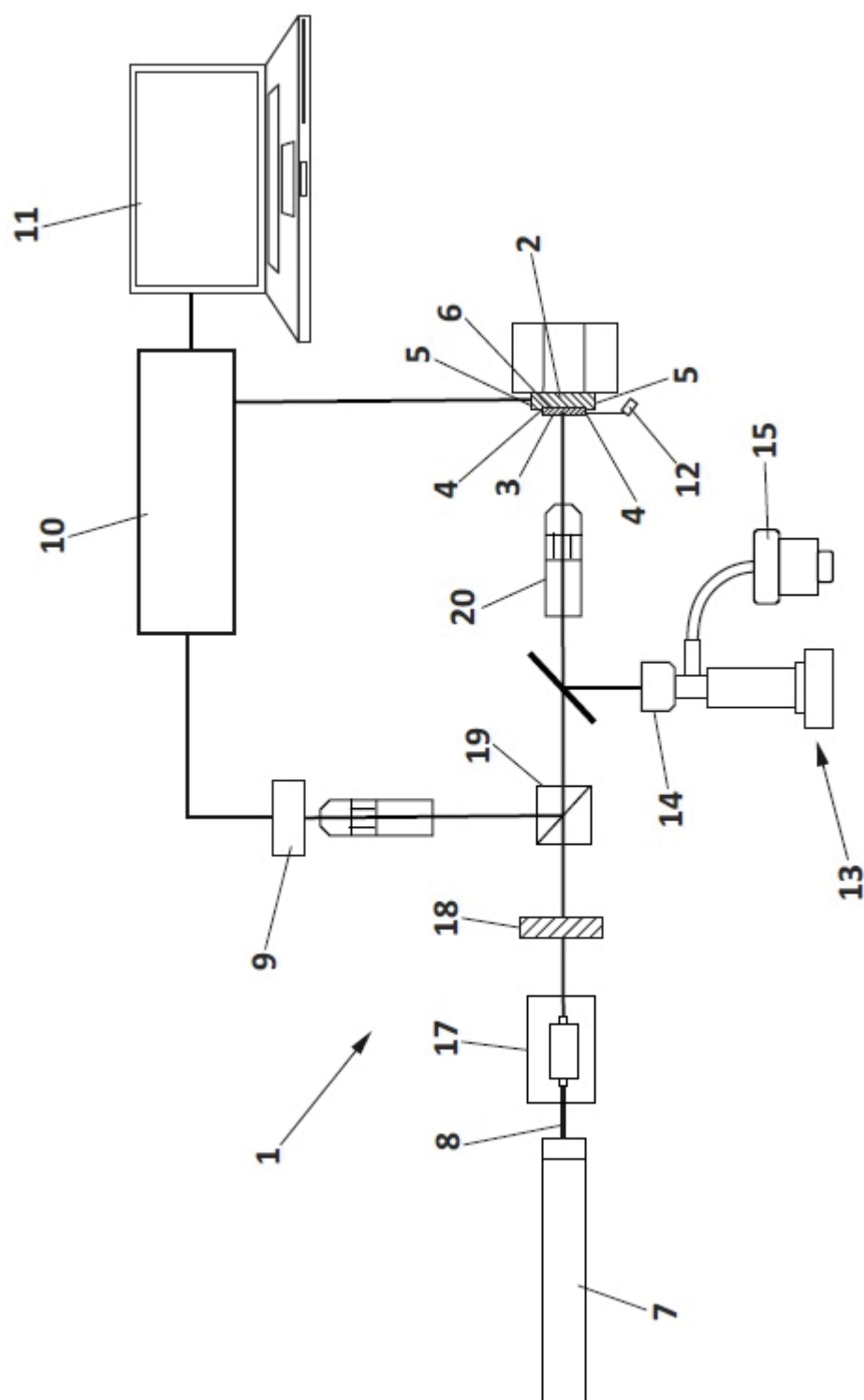


FIG. 1

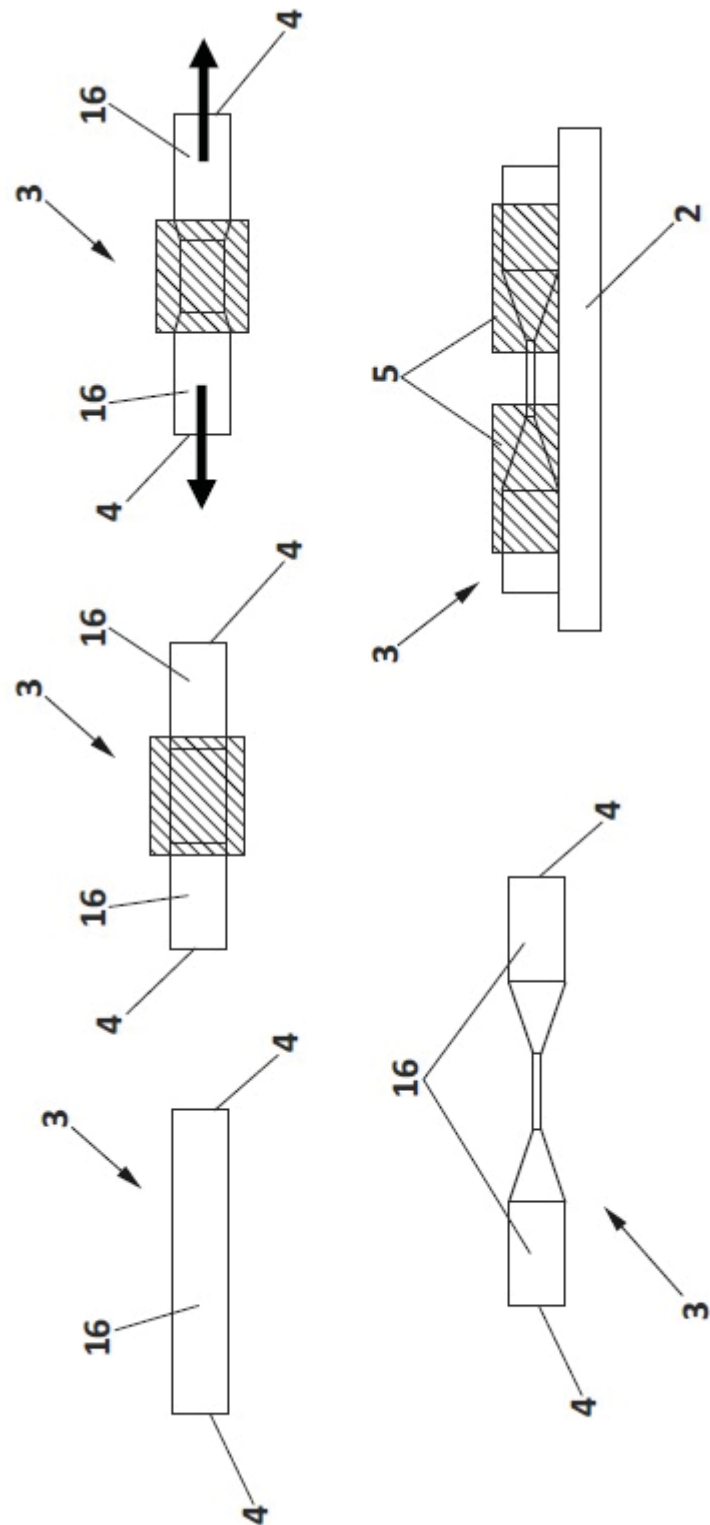


FIG. 2

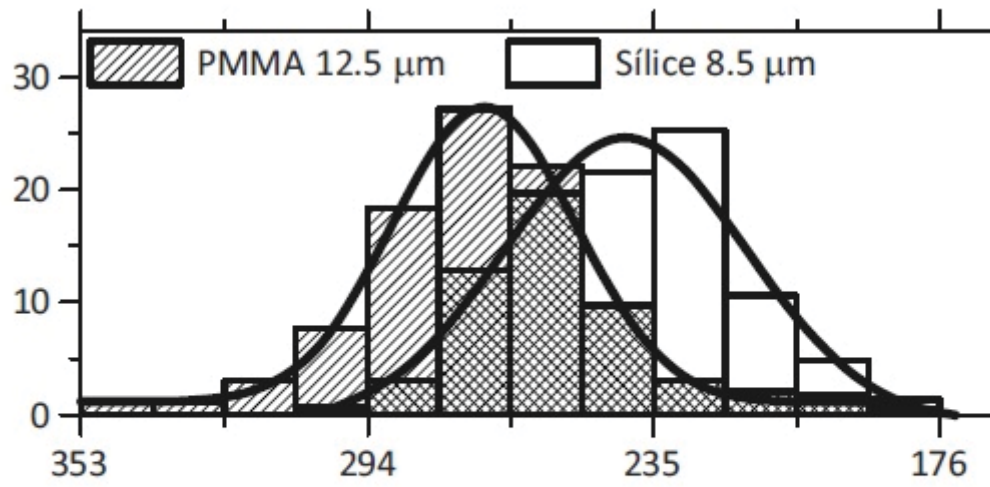


FIG. 3

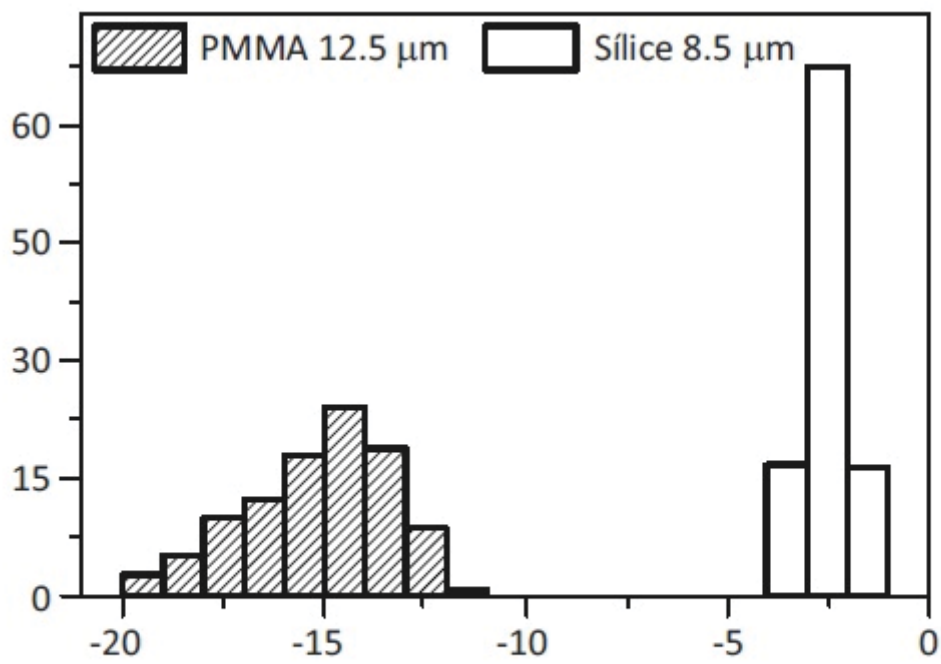


FIG. 4

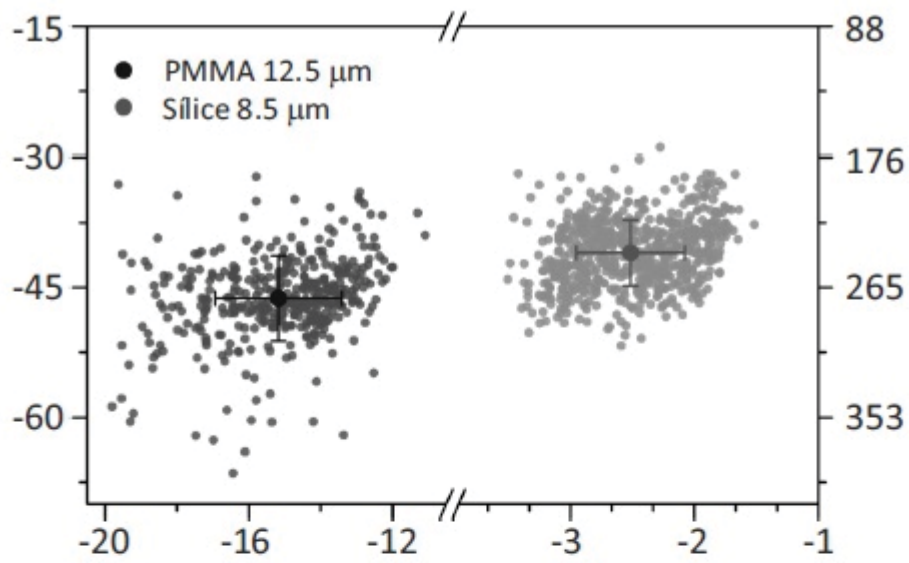


FIG. 5

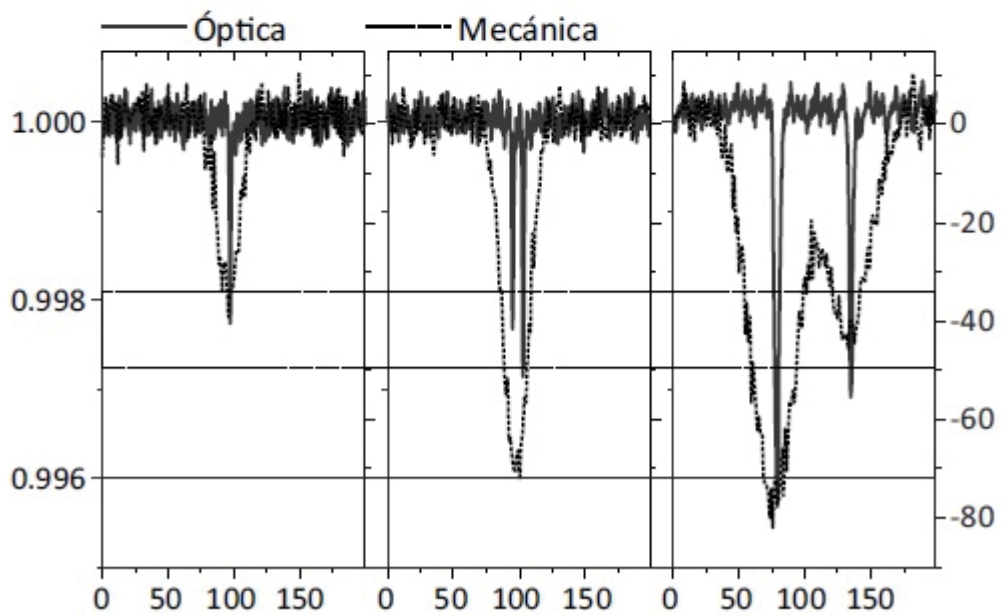


FIG. 6