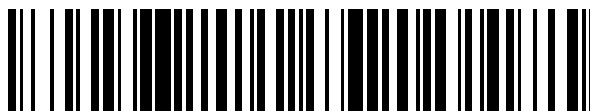


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 362**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

G01N 24/12 (2006.01)

G01R 33/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2018 PCT/US2018/044409**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019 WO19027917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2018 E 18842062 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2022 EP 3662293**

54 Título: **Sistema sensor que comprende un cartucho de muestras que incluye una membrana flexible para soportar una muestra**

30 Prioridad:

31.07.2017 US 201762539241 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.01.2023

73 Titular/es:

**QUANTUM DIAMOND TECHNOLOGIES INC.
(100.0%)
28 Dane Street
Somerville, MA 02143, US**

72 Inventor/es:

**CONNOLLY, COLIN B.;
BLANEY, GILES PARKER;
LENNHOFF, AKIM;
RANDALL, JEFFREY D.;
QUINTUS-BOSZ, HARALD;
SCHECHTER, STUART ERIC;
RITSHER, KENNETH ALAN;
HOSSEINKHANNAZER, HOOMAN y
MCKINNON, GRAHAM**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 932 362 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema sensor que comprende un cartucho de muestras que incluye una membrana flexible para soportar una muestra

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. nº 62/539,241 presentada el 31 de julio de 2017, titulada MÉTODOS Y APARATOS PARA LA MEDICIÓN DE MUESTRAS.

Antecedentes

10 Varias aplicaciones de detección se benefician de una mayor intensidad de la señal y una mayor resolución espacial al acercar la muestra que ha de ser medida a una superficie de detección. Un ejemplo es la medición de campos magnéticos de estructuras magnéticas microscópicas, como muestras que contienen pequeñas partículas magnéticas o pequeños dominios magnéticos en un material sólido. El campo magnético cerca de la muestra varía espacialmente en una escala similar a la de la estructura magnética, mientras que, en cambio, el campo medido a una distancia de separación de la muestra varía en una escala similar a la distancia de separación. Además, la magnitud del campo magnético producido por un dipolo magnético de un componente individual en la muestra disminuye en gran medida con la distancia de separación, lo que debilita la señal magnética disponible. Por lo tanto, sería ventajoso acercar mucho la muestra al sensor.

15 Otras aplicaciones de detección también se benefician de la proximidad a una superficie de detección. Estas pueden incluir: (1) mediciones de reflexión interna total que aprovechan la resonancia de plasmones superficiales en una interfaz reflectante, que puede depender sensiblemente de la presencia de moléculas objetivo a distancias de la interfaz más pequeñas que la longitud de onda óptica; (2) termometría de fuentes localizadas de calentamiento y enfriamiento, como partículas estimuladas óptica o eléctricamente; y (3) detección de campo eléctrico microscópico, que es similar a la detección de campo magnético en su dependencia de la distancia de separación desde una fuente de señal microscópica.

20 Estas y otras aplicaciones de detección dependientes de la proximidad pueden depositar la muestra directamente sobre una superficie de detección para minimizar la distancia de separación. Esta superficie de detección puede consistir en una matriz regular o aleatoria de elementos de detección individuales, que se pueden usar para construir una imagen de la cantidad medida sobre una zona de la superficie de detección.

Ejemplo de una tecnología de detección: formación de imágenes magnéticas de campo amplio con centros NV en diamante

30 Un ejemplo de una tecnología de sensores que depende de la proximidad a la muestra es la formación de imágenes magnéticas de campo amplio con centros nitrógeno-vacante (NV) en diamantes. Los centros NV presentan un comportamiento de resonancia magnética que depende sensiblemente del campo magnético vectorial y que puede leerse ópticamente utilizando la luz emitida por los centros NV y recogida en el campo lejano con óptica de formación de imágenes. Esta tecnología se puede utilizar para construir mapas de alta resolución del campo magnético vectorial en un campo amplio de visión en la superficie del diamante.

35 Los centros NV resultan de la sustitución de dos átomos de carbono adyacentes en la red cristalina del diamante con un átomo de nitrógeno y un sitio vacío (una vacante). Mientras que los centros NV se pueden dar con diferentes estados de carga electrónica, la discusión aquí se refiere al centro NV con carga negativa. Las FIGURAS 1A y 1B ilustran una estructura de centro NV y un diagrama de nivel de energía. Cada centro NV tiene un espín electrónico y un fuerte momento magnético que proporciona sensibilidad a los campos magnéticos. En un campo magnético B distinto de cero, los estados con proyección de espín $m_s = +1$ y $m_s = -1$ cambian de energía. Los centros NV se pueden diseñar en una capa delgada en la superficie de sensor de diamante.

40 La detección magnética NV se puede realizar observando la fluorescencia dependiente del espín de sensores NV. Cuando se excita con luz verde desde el estado electrónico fundamental, los centros NV emiten fluorescencia roja. Debido a las trayectorias de decaimiento del estado excitado que no conservan el espín (FIGURA 1A), y a un largo tiempo de coherencia de espín, el centro NV se polariza bajo la excitación óptica. Una vez polarizado, el estado cuántico del espín central NV puede manipularse con campos de frecuencia de microondas externos e interrogarse de forma remota con luz verde adicional, ya que la tasa de fluorescencia del centro NV depende de la proyección del espín del estado fundamental. En conjunto, estas propiedades permiten la resonancia magnética detectada ópticamente (ODMR, por sus siglas en inglés), en la que el entorno magnético del centro NV se mide mediante la observación óptica de su cambio de estado cuántico en respuesta a los campos de microondas aplicados.

50 La FIGURA 2 ilustra un diagrama esquemático de un ejemplo de un aparato 200 de formación de imágenes magnéticas de diamante de campo amplio. El campo magnético en la superficie 210 del sensor de diamante se determina observando la fluorescencia 220 de una capa superficial delgada 230 de centros NV 240 excitados por la luz 250 de excitación, utilizando la óptica 260 de formación de imágenes representada por el icono de cámara. Una modalidad de formación de imágenes de campo amplio de detección magnética de centros NV puede interrogar simultáneamente campos de visión de más de 1 mm con resolución espacial submicrónica. En esta modalidad, la fluorescencia 220 de centros NV se recoge simultáneamente desde todo el campo de visión. A partir de imágenes de fluorescencia de

centros NV obtenidas en diferentes condiciones de un campo 270 de activación de microondas aplicado (por ejemplo, frecuencia, dirección, polarización o amplitud variadas) sobre el mismo campo de visión, se puede determinar el campo magnético en cada píxel. En la Solicitud de Patente Internacional nº PCT/US17/057628, presentada el 20 de octubre de 2017 y titulada METHODS AND APPARATUS FOR MAGNETIC PARTICLE ANALYSIS USING WIDE-FIELD DIAMOND MAGNETIC IMAGING, publicada el 26 de abril de 2018 como WO 2018/075913 A1, se describen detalles adicionales de la operación del aparato de formación de imágenes magnéticas de diamante de campo amplio.

Dado que no es necesario escanear una sonda fina sobre el campo de visión, se pueden obtener rápidamente imágenes de alta resolución de muestras líquidas o con forma irregular. La tecnología de formación de imágenes es compatible con una amplia gama de condiciones ambientales, incluidas la temperatura y la presión ambientales, lo que permite la aplicación a muestras magnéticas sensibles a la temperatura o a los productos químicos. Los sistemas de formación de imágenes magnéticas de diamante de campo amplio se utilizan ahora regularmente en investigación para estudios magnéticos biológicos y geofísicos. Véase Barry, J. F., Turner, M. J., Schloss, J. M., Glenn, D. R., Song, Y., Lukin, M. D., Park, H. y Walsworth, R. L., Optical magnetic detection of single-neuron action potentials using quantum defects in diamond, *PNAS* **113**, 14133-14138 (2016); Le Sage, D., Arai, K., Glenn, D. R., DeVience, S. J., Pham, L. M., Rahn-Lee, L., Lukin, M. D., Yacoby, A., Komeili, A., y Walsworth, R. L., Optical magnetic imaging of living cells, *Nature* **496**, 486-489 (2013); Fu, R. R., Weiss, B. P., Lima, E. A., Kehayias, P., Araujo, J. F. D. F., Glenn, D. R., Gelb, J., Einsle, J. F., Bauer, A. M., Harrison, R. J., Ali, G. A. H., y Walsworth, R. L., Evaluating the paleomagnetic potential of single zircon crystals using the Bishop Tuff, *Earth Planet. Sci. Lett.* **458**, 1-13 (2017); Fu, R. R., Weiss, B. P., Lima, E. A., Harrison, R. J., Bai, X.-N., Desch, S. J., Ebel, D. S., Suavet, C., Wang, H., Glenn, D., Le Sage, D., Kasama, T., Walsworth, R. L., y Kuan, A. T., Solar nebula magnetic fields recorded in the Semarkona meteorite, *Science* (80-). **346**, 1089-1092 (2014); Rahn-Lee, L., Byrne, M. E., Zhang, M., Le Sage, D., Glenn, D. R., Milbourne, T., Walsworth, R. L., Vali, H., y Komeili, A. A., Genetic Strategy for Probing the Functional Diversity of Magnetosome Formation, *PLoS Genet.* **11**, (2015); y Glenn, D. R., Lee, K., Park, H., Weissleder, R., Yacoby, A., Lukin, M. D., Lee, H., Walsworth, R. L., y Connolly, C. B., Single-cell magnetic imaging using a quantum diamond microscope. *Nat. Methods* **12**, 736-738 (2015).

Depositar muestras directamente sobre la superficie de un sensor, aunque puede generar una buena sensibilidad de medición y resolución espacial, tiene una serie de desventajas, como la posibilidad de contaminación entre muestras y el tiempo necesario para suministrar las muestras al sensor y limpiar la superficie de sensor después de la medición. Por lo tanto, existe la necesidad de un cartucho de muestras mejorado para medir propiedades de la muestra muy cerca de una superficie de detección que reduzca o elimine las desventajas arriba descritas.

El documento US 2011/062957 A1 describe un biosensor magnético integrado ópticamente que incluye un centro de resonancia magnética detectada ópticamente (ODMR) y una capa fluidica configurada para contener una solución que comprende analitos, estando dispuesta la capa fluidica sobre el centro ODMR. Una fuente de luz que genera luz incidente excita electrones dentro del centro ODMR de un estado fundamental a un estado excitado y una antena de radiofrecuencia (RF) genera un campo de RF incidente con frecuencias que corresponden a transiciones de estado fundamental en el centro ODMR. El centro ODMR produce luz emitida cuando es iluminado por la luz incidente. Las características de la luz emitida están influidas por el campo de RF y nanopartículas magnéticas adheridas a los analitos. También se proporciona un método para detectar analitos usando resonancia magnética detectada ópticamente. Los centros ODMR pueden ser centros nitrógeno-vacante (NV) en una red cristalina de diamante.

Breve resumen

La invención está dirigida a un sistema sensor tal como se define en la reivindicación 1. En las reivindicaciones dependientes se definen realizaciones preferidas del sistema sensor. Varias realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a aparatos que usan una membrana delgada como membrana de transferencia de muestras para soportar una muestra para una medición por un sensor, en donde la membrana se desplaza para que esté en contacto estrecho con el sensor y métodos para usar dichos aparatos.

De acuerdo con una o más realizaciones, un sistema sensor incluye un sensor que tiene una superficie de sensor, un cartucho de muestras que incluye una o más membranas flexibles y un marco de membrana, incluyendo el marco de membrana una o más aberturas cubiertas por la o las membranas flexibles que definen uno o más pocillos para contener una o más muestras, teniendo la membrana flexible un lado de muestra que soporta la muestra y un lado de sensor opuesto, pudiendo insertarse el cartucho de muestras de manera extraíble en el sistema sensor de manera que el lado de sensor de la membrana flexible se coloca encima y frente a la superficie de sensor, un mecanismo de desplazamiento que se puede accionar para desplazar la membrana flexible hacia la superficie de sensor de modo que la muestra se mueva a una posición más cercana a la superficie de sensor, y un sistema óptico de formación de imágenes que detecta la luz emitida desde el sensor. En determinadas realizaciones, el mecanismo de desplazamiento puede configurarse y disponerse para crear una presión diferencial entre el lado de muestra y el lado de sensor del marco de membrana, y la membrana flexible puede configurarse y disponerse para que sea desplazable en sentido opuesto al marco de membrana para entrar en contacto con la superficie de sensor. El mecanismo de desplazamiento puede configurarse y disponerse para crear una presión diferencial entre el lado de muestra y el lado de sensor de la membrana flexible, y la membrana flexible puede configurarse y disponerse para que sea desplazable en sentido opuesto al marco de membrana para entrar en contacto con la superficie de sensor. En algunas realizaciones, la membrana flexible se puede dimensionar para que sea desplazable en sentido opuesto al marco de membrana para

entrar en contacto con la superficie de sensor bajo la presión diferencial entre el lado de muestra y el lado de sensor de la membrana flexible. En determinadas realizaciones, la superficie de sensor puede ser una superficie de sensor de diamante de nitrógeno-vacante (NV), y el sistema óptico de formación de imágenes genera imágenes de la fluorescencia emitida desde la superficie de sensor de diamante NV. En algunas realizaciones, la membrana flexible se puede funcionalizar en el lado de muestra para interactuar con una muestra. En determinadas realizaciones, la membrana flexible puede ser una membrana flexible de nitruro de silicio, una membrana flexible de silicio cristalino, una membrana flexible de dióxido de silicio, una membrana flexible de carbono amorfo, una membrana flexible de grafito, una membrana flexible de nitruro de boro, una membrana flexible de metal, o una membrana flexible de polímero. En determinadas realizaciones, la membrana flexible se puede desplazar a una distancia en un centro de la membrana flexible de hasta 100 μm , tal como hasta 50 μm , en sentido opuesto al marco de membrana. En algunas realizaciones, el cartucho de muestras puede incluir además una tapa de cartucho de muestras configurada y dispuesta para superponerse al marco de membrana, incluyendo la tapa de cartucho de muestras una ventana sobre al menos una parte de la membrana flexible. En determinadas realizaciones, la tapa de cartucho de muestras puede incluir una pluralidad de ventanas sobre una pluralidad correspondiente de membranas flexibles. En algunas realizaciones, la tapa de cartucho de muestras puede incluir además una entrada de gas para presurizar el lado de muestra de la membrana flexible. En estas realizaciones, la presión diferencial puede estar en un intervalo entre 0,1 kPa y 1000 kPa. En determinadas realizaciones, el cartucho de muestras puede incluir además un soporte de marco de membrana asegurado al marco de membrana en el lado de muestra de la membrana flexible. En algunas de estas realizaciones, el soporte de marco de membrana se puede asegurar a una pluralidad de membranas, tal como 96 membranas. En determinadas realizaciones, el soporte de marco de membrana puede estar hecho de alúmina con un espesor en un intervalo entre 0,25 mm y 5 mm. En algunas realizaciones, el sistema óptico de formación de imágenes puede incluir además una vejiga flexible alrededor de un elemento óptico del sistema óptico de formación de imágenes y una entrada de gas para presurizar el lado de muestra de la membrana flexible, estando configurada y dispuesta la vejiga flexible para acoplarse de forma separable y formar un sello con el soporte de marco de membrana. En estas realizaciones, la presión diferencial puede estar en un intervalo entre 0,1 kPa y 1000 kPa.

Breve descripción de los dibujos

Lo anterior será evidente a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones ejemplares tal como se ilustran en los dibujos adjuntos, en los que los mismos caracteres de referencia se refieren a las mismas partes en las diferentes vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, sino que se enfatizan realizaciones ilustrativas.

La FIGURA 1A muestra un ejemplo de un diagrama de nivel de energía de centro NV. La FIGURA 1B muestra un ejemplo de una estructura atómica de centro NV.

La FIGURA 2 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de un aparato de formación de imágenes magnéticas de diamante NV de campo amplio.

La FIGURA 3A es una vista en sección transversal simplificada que ilustra el uso con un aparato sensor de un cartucho de muestras de un solo pocillo de acuerdo con una o más realizaciones. La FIGURA 3B es una fotografía de una membrana flexible de nitruro de silicio de 2 mm \times 2 mm de 1 μm de espesor en un marco de membrana de silicio de acuerdo con una o más realizaciones.

La FIGURA 4A es una vista en sección transversal simplificada que ilustra el uso con un aparato sensor de un cartucho de muestras de múltiples pocillos que incluye una línea de bomba en la periferia del cartucho de muestras de acuerdo con una o más realizaciones. La FIGURA 4B muestra vistas superiores que ilustran diseños ejemplares de varias matrices de membrana de múltiples pocillos que se muestran en la FIGURA 4A.

La FIGURA 5A es una vista en sección transversal simplificada que ilustra el uso con un aparato sensor de un cartucho de muestras de múltiples pocillos que incluye una línea de bomba incorporada en el sustrato de sensores de acuerdo con una o más realizaciones. La FIGURA 5B muestra vistas superiores que ilustran diseños ejemplares de varias matrices de membrana de múltiples pocillos que se muestran en la FIGURA 5A.

Las FIGURAS 6A-6F ilustran una secuencia esquemática de accionamiento neumático mediante la evacuación del lado de sensor de la membrana flexible para un pocillo muestra individual de acuerdo con una o más realizaciones.

La FIGURA 7 es una vista en sección transversal simplificada que ilustra el uso con un aparato sensor de un cartucho de muestras de un solo pocillo que incluye una tapa de cartucho de muestras de acuerdo con una o más realizaciones.

La FIGURA 8A es una vista en sección transversal simplificada que ilustra el uso con un aparato sensor de un cartucho de muestras de múltiples pocillos que incluye una junta en la periferia de la tapa de cartucho de muestras de acuerdo con una o más realizaciones. La FIGURA 8B muestra vistas superiores que ilustran diseños ejemplares de varias matrices de membrana de múltiples pocillos que se muestran en la FIGURA 8A.

FIGURA 9A es una vista en sección transversal simplificada que ilustra el uso con un aparato sensor de un cartucho de muestras de múltiples pocillos que incluye zonas cerradas individuales de acuerdo con una o más realizaciones. La FIGURA 9B muestra vistas superiores que ilustran diseños ejemplares de varias matrices de

membrana de múltiples pocillos que se muestran en la FIGURA 9A.

Las FIGURAS 10A-10F ilustran una secuencia esquemática de accionamiento neumático por presurización del lado de muestra de la membrana flexible para un solo pocillo de muestra de acuerdo con una o más realizaciones.

5 Las FIGURAS 11A y 11B son vistas transversales y superiores simplificadas, respectivamente, que ilustran una membrana flexible de transferencia de muestras de un solo pocillo que incluye una malla de soporte de membrana de acuerdo con una o más realizaciones.

10 La FIGURA 12A es una vista en perspectiva simplificada de un casete de cartucho para usarlo en la realización de un ensayo de acuerdo con una o más realizaciones. La FIGURA 12B es una vista en sección transversal simplificada de una parte del casete de cartucho que se muestra en la FIGURA 12A. La FIGURA 12C es otra vista en sección transversal simplificada de una parte del casete de cartucho que se muestra en la FIGURA 12A. La FIGURA 12D es una vista en perspectiva simplificada que ilustra el uso con un aparato sensor del casete de cartucho que se muestra en la FIGURA 12A de acuerdo con una o más realizaciones. La FIGURA 12E es una vista en sección transversal simplificada que ilustra el uso con un aparato sensor de un casete de cartucho que incluye una tapa de cartucho de muestras de acuerdo con una o más realizaciones.

15 La FIGURA 13A es una vista en sección transversal simplificada que ilustra un sistema sensor que incluye un cartucho de muestras de acuerdo con una o más realizaciones. La FIGURA 13B es una vista en perspectiva simplificada (en despiece ordenado) del sistema sensor que se muestra en la FIGURA 13A.

La FIGURA 14 es una vista en sección transversal simplificada que ilustra un sistema sensor que incluye una tapa de cartucho de muestras de acuerdo con una o más realizaciones.

20 La FIGURA 15A es un diagrama de flujo de un método para realizar un ensayo usando un sistema sensor de acuerdo con una o más realizaciones. La FIGURA 15B es un diagrama de flujo del desplazamiento de una membrana flexible en sentido opuesto al marco de membrana hacia una superficie de sensor usando un sistema sensor de acuerdo con una o más realizaciones.

25 Las FIGURAS 16A-16C muestran gráficos de desviación de membrana (μm) en función de la presión diferencial (kPa), usando la Ecuación 1.

Las FIGURAS 17A-17C ilustran una secuencia esquemática del uso de un cartucho de muestras con una cubierta protectora de acuerdo con una o más realizaciones.

30 Las FIGURAS 18, 19 y 20 ilustran esquemas de sistemas de vacío para mecanismos de desplazamiento para accionar neumáticamente la membrana flexible de transferencia de muestras utilizando un sistema sensor de acuerdo con una o más realizaciones.

Las FIGURAS 21 y 22 ilustran esquemas de sistemas de presión para mecanismos de desplazamiento para accionar neumáticamente la membrana flexible de transferencia de muestras utilizando un sistema sensor de acuerdo con una o más realizaciones.

35 La FIGURA 23 muestra imágenes ópticas de luz de banda estrecha (longitud de onda $651 \pm 4 \text{ nm}$) transmitida a través de un sensor de diamante y una membrana de nitruro de silicio de 500 nm de espesor utilizando un sistema sensor de acuerdo con una o más realizaciones.

40 Las FIGURAS 24a-24e muestran partes de imágenes magnéticas obtenidas con formación de imágenes magnéticas de diamante de campo amplio, que muestran señales dipolares de partículas magnéticas magnetizadas horizontalmente usando un sistema sensor de acuerdo con una o más realizaciones. La FIGURA 24f es un gráfico de la distancia desde el ajuste hasta el modelo dipolo en función de la distancia desde el centro del talón hasta el diamante.

Descripción detallada

45 Diversas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a aparatos que usan una membrana delgada como membrana de transferencia de muestras para soportar una muestra para una medición por medio de un sensor, en donde la membrana se desplaza para que esté en contacto estrecho con el sensor, y a métodos para usar dicho aparato.

50 Algunas realizaciones descritas en la presente memoria incluyen aquellas que utilizan un accionamiento neumático de la membrana usando presión diferencial, donde el accionamiento neumático puede referirse a la operación bajo presión de cualquier gas o líquido de proceso, incluyendo un accionamiento hidráulico. Las realizaciones también pueden incluir accionamiento mecánico, en el que la membrana o su marco de membrana de soporte se desplazan con respecto al sensor para establecer contacto estrecho, y accionamiento electrostático, en el que la membrana se desplaza por medio de fuerzas electrostáticas.

Depositar muestras directamente sobre la superficie de un sensor puede generar una buena sensibilidad de medición y resolución espacial, pero también tiene inconvenientes. Dos inconvenientes importantes son la posibilidad de

contaminación entre las muestras y el tiempo necesario para llevar las muestras al sensor y limpiar la superficie de sensor después de la medición. Las muestras que comprenden suspensiones líquidas o polvos de partículas secas presentan un desafío particular de contaminación potencial y el tiempo requerido para la preparación de la muestra y la limpieza del sensor. Las mediciones de alto rendimiento de muchas muestras pueden verse obstaculizadas por el tiempo necesario para la transferencia entre muestras, que puede exceder el tiempo de medición.

Estos inconvenientes se abordan apoyando las muestras en una membrana delgada que puede interactuar rápidamente con el sensor y retirarse rápidamente del mismo. Se evita la contaminación del sensor y la contaminación entre muestras porque solo la membrana, y no la muestra, entra en contacto con el sensor. Además, se pueden depositar múltiples muestras individuales al mismo tiempo en membranas individuales separadas y luego medirlas en una secuencia rápida sin necesidad de limpiar el sensor entre mediciones de muestras.

La FIGURA 3A es una vista en sección transversal que ilustra un cartucho 300 de muestras sobre una superficie 310 de sensor de acuerdo con una o más realizaciones. El cartucho 300 de muestras comprende un marco de membrana o estructura 320 de marco de membrana que, junto con una membrana flexible 340, define un pocillo 330 para contener una muestra. La FIGURA 3A muestra un solo pocillo en un cartucho 300; las FIGURAS 4A y 4B ilustran un cartucho 400 de muestras de múltiples pocillos, descrito más abajo.

Volviendo a la FIGURA 3A, cada cartucho 300 de muestras incluye la membrana flexible 340 suspendida, sobre la cual se coloca una muestra en un pocillo 330 de muestra definido en un marco 320 de membrana. La membrana flexible 340 tiene un lado 305 de muestra y un lado 315 de sensor opuesto. Como se muestra en la FIGURA 3A, y en todas las demás realizaciones a menos que se indique lo contrario, la membrana flexible 340 se deposita sobre el marco 320 de membrana de manera que el lado 315 de sensor de la membrana flexible 340 se coloca arriba y queda orientada hacia una superficie 310 de sensor, la membrana flexible 340 cubre el marco 320 de membrana y sella el lado 305 de muestra con respecto al lado 315 de sensor. La superficie 310 de sensor, que puede ser un sensor de imagen magnética de diamante de nitrógeno-vacante (NV) de campo amplio u otra superficie de sensor, incluye uno o más sensores 310 situados en un sustrato 312 de sensores. Junto a la superficie 310 de sensor están previstos espaciadores 325 en el sustrato 312 de sensores, para colocar el marco 320 de membrana y evitar que la membrana flexible 340 y el marco 320 de membrana entren en contacto con la superficie 310 de sensor antes del accionamiento neumático. La superficie 310 de sensor puede estar hundida por debajo del nivel de los espaciadores 325, tal como se muestra en la FIGURA 3A, o a nivel con los espaciadores 325, o sobresalir por encima de los espaciadores 325 a una altura que no provoque la ruptura de la membrana flexible 340.

Como también se muestra en la FIGURA 3A, una junta 335 en el sustrato 312 de sensores sella el sustrato 312 de sensores alrededor del perímetro del marco 320 de membrana. El cartucho 300 de muestras incluye un puerto para una línea 350 de bomba. Cuando la línea 350 de bomba aplica aspiración evacuando el lado 315 de sensor de la membrana flexible 340, se forma una presión diferencial entre el lado 305 de muestra y el lado 315 de sensor a través de la membrana flexible 340 para desplazarla a una posición más cercana a la superficie 310 de sensor, tal como se describe más abajo. Este accionamiento neumático minimiza la distancia de separación entre la superficie 310 de sensor y la muestra 330 en todo el campo de visión de formación de imágenes. Este método de accionamiento también permite que la membrana flexible 340 se adapte a la superficie 310 de sensor y acomoda cualquier posicionamiento imperfecto de la membrana flexible 340 y el marco 320 de membrana sobre la superficie 310 de sensor.

La FIGURA 4A es una vista en sección transversal que ilustra un cartucho 400 de muestras de múltiples pocillos colocado sobre una superficie 410 de sensor de acuerdo con una o más realizaciones. El cartucho 400 de muestras comprende un marco de membrana o estructura 420 de marco de membrana que define un pocillo 430 para contener una muestra. Cada pocillo 430 de muestra incluye una membrana flexible 440 suspendida, sobre la cual se coloca la muestra en un pocillo 430 de muestra definido en el marco 420 de membrana. La membrana flexible 440 tiene un lado 405 de muestra y un lado 415 de sensor opuesto. La superficie 410 de sensor, que puede ser un sensor de imágenes magnéticas de diamante NV de campo amplio u otra superficie de sensor, incluye uno o más sensores 410 colocados en un sustrato 412 de sensores. Junto a la superficie 410 de sensor están previstos espaciadores 425 en el sustrato 412 de sensores, para colocar el marco 420 de membrana y evitar que la membrana flexible 440 y el marco 420 de membrana entren en contacto con la superficie 410 de sensor antes del accionamiento neumático. La superficie 410 de sensor puede estar hundida por debajo del nivel de los espaciadores 425, tal como se muestra en la FIGURA 4A, o a nivel con los espaciadores 425, o sobresalir por encima de los espaciadores 425 a una altura que no provoque la ruptura de la membrana flexible 440.

Como también se muestra en la FIGURA 4A, una junta 435 en el sustrato 412 de sensores sella el sustrato 412 de sensores alrededor de la periferia del cartucho 400 de muestras. El cartucho 400 de muestras incluye un puerto para una línea 450 de bomba. Cuando la línea 450 de bomba aplica aspiración evacuando el lado 415 de sensor de la membrana flexible 440, se forma una presión diferencial entre el lado 405 de muestra y el lado 415 de sensor a través de la membrana flexible 440 para desplazarla a una posición más cercana a la superficie 410 de sensor. Este accionamiento neumático minimiza la distancia de separación entre la superficie 410 de sensor y la muestra 430 sobre todo el campo de visión de formación de imágenes. Este método de accionamiento también permite que la membrana flexible 440 se adapte a la superficie 410 de sensor y acomoda cualquier posicionamiento imperfecto de la membrana flexible 440 y el marco 420 de membrana sobre la superficie 410 de sensor. La FIGURA 4B ilustra una vista en planta de cartuchos 400A, 400B y 400C de muestras que incluyen 8, 24 y 96 membranas flexibles 440, respectivamente.

En la realización mostrada en las FIGURAS 4A y 4B, la línea 450 de bomba y la junta 435 están situadas en la periferia del cartucho 400 de muestras. En otra realización, que se muestra en la FIGURA 5A, la línea 550 de bomba está incorporada en el sustrato 512 de sensores, y la junta 535 sella el sustrato 512 de sensores alrededor del perímetro del marco de membrana o estructura 520 de marco de membrana, junto con los espaciadores 525. Esta realización permite el accionamiento de tan solo una membrana flexible 540 de un cartucho 500 de muestras que puede tener 8, 24 o 96 membranas flexibles 540, tal como se ilustra en la vista en planta que se muestra en la FIGURA 5B de los cartuchos 500A, 500B y 500C de muestras, respectivamente, dejando las otras membranas 540 no afectadas por el accionamiento hasta la medición de las mismas. Esta estrategia también puede minimizar el volumen de la cámara de vacío, el flujo de gas y la superficie de contacto necesarios para el sello de vacío. La FIGURA 5A también muestra la superficie 510 de sensor, la muestra 530, el lado 505 de muestra y el lado 515 de sensor de la membrana flexible 540.

Las FIGURAS 6A-6F ilustran un ejemplo de una secuencia esquemática de accionamiento neumático para el pocillo de muestra individual mostrado en la FIGURA 3A de acuerdo con una o más realizaciones. Para mayor claridad, en las FIGURAS 6A-6F solo se indican los elementos de la FIGURA 3A introducidos por primera vez o modificados. Las etapas son las siguientes: (1) La muestra 330 se carga sobre la superficie 340 de membrana flexible (como se muestra en la FIGURA 6A). (2) El marco 320 de membrana se pone en contacto con la junta 335 de cámara de vacío para formar un sello con el sustrato 312 de sensores (como se muestra en la FIGURA 6B). La membrana flexible 340 cubre y sella el lado 305 de muestra con respecto al lado 315 de sensor de la membrana flexible 340. Junto a la superficie 310 de sensor están previstos espaciadores 325 en el sustrato 312 de sensores, para evitar que la membrana flexible 340 y el marco 320 de membrana entren en contacto con la superficie 310 de sensor antes del accionamiento neumático. (3) La cámara de vacío se evacúa mediante bombeo en la línea 350 de bomba, y la presión diferencial resultante a través de la membrana flexible 340 desplaza la misma a una posición más cercana a la superficie 310 de sensor (como se muestra en la FIGURA 6C). Este desplazamiento puede ser a una distancia en el centro de la membrana flexible 340 de hasta 100 μm , tal como 50 μm , en sentido opuesto al marco 320 de membrana. (4) A una presión diferencial suficiente, la membrana flexible 340 se desplaza en contacto con la superficie 310 de sensor sobre una zona que incluye el campo de visión de medición (como se muestra en la FIGURA 6D). (5) Después de la medición por medio del sensor, la cámara de vacío se ventila para aliviar la presión diferencial, haciendo que la membrana flexible 340 se relaje hasta un estado de bajo desplazamiento (como se muestra en la FIGURA 6E). (6) El marco 320 de membrana se levanta alejándose del sensor para romper el sello de la cámara de vacío, lo que permite que un nuevo pocillo de muestra interactúe con el sensor (como se muestra en la FIGURA 6F).

La FIGURA 7 es una vista en sección transversal que ilustra un cartucho 700 de muestras que incluye una tapa 760 de cartucho de muestras sobre una superficie 710 de sensor de acuerdo con una o más realizaciones. La tapa 760 de cartucho de muestras incluye una ventana 765 que es transparente a la luz emitida desde el sensor 710. Un marco de membrana o estructura 720 de marco de membrana define, junto con una membrana flexible 740, un pocillo 730 para contener una muestra. La FIGURA 7 muestra un solo pocillo en un cartucho 700; las FIGURAS 8A y 9A ilustran respectivamente cartuchos 800 y 900 de muestras de múltiples pocillos, que se describen más abajo.

Volviendo a la FIGURA 7, la membrana flexible 740 puede ser desplazada por una presión diferencial entre el lado 705 de muestra y el lado 715 de sensor de la membrana flexible 740, formada mediante la presurización del lado 705 de muestra a través de la línea 750 de bomba. La aplicación de presión positiva al lado 705 de muestra de la membrana flexible 740 permite presiones diferenciales correspondientes a varias veces la presión atmosférica, para producir hasta el máximo desplazamiento de la membrana. Después de cargar el pocillo 730 de muestra con una muestra, se aplica una tapa 760 de cartucho de muestras a una junta 735 alrededor de la periferia del marco 720 de membrana para formar un sello. La zona cerrada que contiene el pocillo 730 de muestra se presuriza después para desplazar la membrana flexible 740 a una posición más cercana a la superficie 710 de sensor. Junto a la superficie 710 de sensor están previstos espaciadores 725 en el sustrato 712 de sensores, para colocar el marco 720 de membrana y evitar que la membrana flexible 740 y el marco 720 de membrana entren en contacto con la superficie 710 de sensor antes del accionamiento neumático. La superficie 710 de sensor puede estar hundida por debajo del nivel de los espaciadores 725, tal como se muestra en la FIGURA 7, o a nivel con los espaciadores 725, o sobresalir por encima de los espaciadores 725 a una altura que no provoque la ruptura de la membrana flexible 740.

La FIGURA 8A es una vista en sección transversal que ilustra un cartucho 800 de muestras de múltiples pocillos que incluye una tapa 860 de cartucho de muestras sobre una superficie 810 de sensor de acuerdo con una o más realizaciones. La tapa 860 de cartucho de muestras incluye una ventana 865 que es transparente a la luz emitida desde el sensor 810. Un marco de membrana o estructura 820 de marco de membrana define un pocillo 830 para contener una muestra. Cada pocillo 830 de muestra incluye una membrana flexible 840 suspendida, sobre la cual se coloca una muestra en el pocillo 830 de muestra definido en el marco 820 de membrana. La membrana flexible 840 tiene un lado 805 de muestra y un lado 815 de sensor opuesto. La superficie 810 de sensor, que puede ser un sensor de formación de imágenes magnéticas de diamante NV de campo amplio u otra superficie de sensor, incluye uno o más sensores 810 dispuestos sobre un sustrato 812 de sensores. Junto a la superficie 810 de sensor están previstos espaciadores 825 en el sustrato 812 de sensores, para colocar el marco 820 de membrana y evitar que la membrana flexible 840 y el marco 820 de membrana entren en contacto con la superficie 810 de sensor antes del accionamiento neumático. La superficie 810 de sensor puede estar hundida por debajo del nivel de los espaciadores 825, tal como se muestra en la FIGURA 8A, o a nivel con los espaciadores 825, o sobresalir por encima de los espaciadores 825 a una altura que no provoque la ruptura de la membrana flexible 840.

Como también se muestra en la FIGURA 8A, una junta 835 en la periferia de la tapa 860 de cartucho de muestras sella el marco 820 de membrana alrededor de la periferia de la tapa 860 de cartucho de muestras. El cartucho 800 de muestras incluye un puerto para una línea 850 de bomba. Cuando se aplica presión a través de la línea 850 de bomba presurizando el lado 805 de muestra de la membrana flexible 840, entre el lado 805 de muestra y el lado 815 de sensor se forma una presión diferencial a través de la membrana flexible 840 para desplazar la misma a una posición más cercana a la superficie 810 de sensor. Este accionamiento neumático minimiza la distancia de separación entre la superficie 810 de sensor y la muestra 830 sobre todo el campo de visión de formación de imágenes. Este método de accionamiento también permite que la membrana flexible 840 se adapte a la superficie 810 de sensor y acomoda cualquier posicionamiento imperfecto de la membrana flexible 840 y el marco 820 de membrana sobre la superficie 810 de sensor. La FIGURA 8B ilustra una vista en planta de los cartuchos 800A, 800B y 800C de muestras que incluyen 8, 24 y 96 membranas flexibles 840, respectivamente. Todas las membranas en un cartucho 800 de muestras de múltiples pocillos pueden desviarse juntas, aunque solo un subconjunto puede situarse en uno o más sensores. En este caso, las otras membranas se desplazarán sin entrar en contacto con una superficie de sensor.

En otra realización, mostrada en la FIGURA 9A, se puede sellar más de un pocillo 930 de muestra de un cartucho 900 de múltiples pocillos con juntas 935 independientes o partes independientes de la misma junta 935 para formar zonas cerradas separadas. Cada zona cerrada se puede presurizar independientemente de las demás mediante líneas 950 de bomba independientes a través de la tapa 960 de cartucho de muestras, lo que minimizaría el número de ciclos de desplazamiento para cada membrana flexible individual (en comparación con la realización que se muestra en las FIGURAS 8A y 8B). La FIGURA 9A también muestra la superficie 910 de sensor sobre el sustrato 912 de sensores, los espaciadores 925, el marco de membrana o estructura 920 de marco de membrana, el lado 905 de muestra y el lado 915 de sensor de la membrana flexible 940, y una ventana 965 que es transparente a la luz emitida desde el sensor 910. La FIGURA 9B ilustra una vista en planta de los cartuchos 900A, 900B y 900C de muestras que incluyen 8, 24 y 96 membranas flexibles 940, respectivamente.

Las FIGURAS 10A-10F ilustran una secuencia esquemática de accionamiento neumático para el pocillo de muestra individual que se muestra en la FIGURA 7, de acuerdo con una o más realizaciones. Para mayor claridad, en las FIGURAS 10A-10F solo se indican los elementos de la FIGURA 7 introducidos por primera vez o modificados. Las etapas son las siguientes: (1) La muestra 730 se carga sobre la superficie 740 de membrana flexible (como se muestra en la FIGURA 10A). (2) La tapa 760 de cartucho de muestras se pone en contacto con la junta 735 de cartucho de muestras para formar un sello y el cartucho 700 de muestras sellado se coloca cerca del sensor 710 (como se muestra en la FIGURA 10B). La membrana flexible 740 cubre y sella el lado 705 de muestra con respecto al lado 715 de sensor de la membrana flexible 740. Junto a la superficie 710 de sensor están previstos espaciadores 725 en el sustrato 712 de sensores, para evitar que la membrana flexible 740 y el marco 720 de membrana entren en contacto con la superficie 710 de sensor antes del accionamiento neumático. (3) El cartucho 700 de muestras se presuriza añadiendo gas (como aire o nitrógeno) a la línea 750 de gas, y la presión diferencial resultante a través de la membrana flexible 740 desplaza la misma a una posición más cercana a la superficie 710 de sensor (como se muestra en la FIGURA 10C). Este desplazamiento puede ser a una distancia en el centro de la membrana flexible 740 de hasta 100 μm , tal como 50 μm , en sentido opuesto al marco 720 de membrana. (4) A una presión diferencial suficiente, la membrana flexible 740 se desplaza para ponerse en contacto con la superficie 710 de sensor sobre una zona que incluye el campo de visión de medición (como se muestra en la FIGURA 10D). (5) Después de la medición por medio del sensor, el cartucho 700 de muestras se ventila para aliviar la presión diferencial, haciendo que la membrana flexible 740 se relaje hasta un estado de bajo desplazamiento (como se muestra en la FIGURA 10E). (6) El cartucho 700 de muestras se levanta del sensor, lo que permite que un nuevo pocillo de muestra interactúe con el sensor (como se muestra en la FIGURA 10F).

La membrana de acuerdo con una o más realizaciones debe ser delgada, flexible, elástica para permitir un desplazamiento suficiente bajo una presión diferencial razonable, e impermeable a la muestra, de modo que la muestra no se filtre a través de la membrana y entre en contacto con la superficie de sensor. El uso de una membrana delgada inhibe la degradación significativa del rendimiento de detección debido a la presencia de la membrana, ya que la distancia entre el sensor y la muestra corresponde al menos al espesor de la membrana. El rendimiento de la membrana se optimiza cuando la membrana es delgada en comparación con la resolución espacial del sensor y lo suficientemente delgada como para garantizar que la magnitud de la señal de la medición solo resulte afectada con moderación. Un espesor de membrana inferior a 1 μm puede lograr estos objetivos en muchos casos, tal como un espesor en un intervalo entre 30 nm y 500 nm, por ejemplo 200 nm.

La membrana de acuerdo con una o más realizaciones también debe ser lo suficientemente robusta para no romperse durante la carga de la muestra, durante la actuación sobre la superficie de sensor, durante la retirada desde la superficie de sensor o durante cualquier otra etapa en el proceso de transferencia y medición de la muestra. Para ser lo suficientemente robusta, la membrana no debe ser más delgada de lo necesario para permitir el accionamiento neumático y garantizar una buena intensidad de señal y resolución espacial para las mediciones de muestras.

Existen muchas tecnologías para producir membranas delgadas independientes de diferentes composiciones. Las membranas se pueden depositar sobre superficies de soporte utilizando procesos tales como depósito físico de vapor, depósito químico de vapor, depósito químico de vapor a baja presión, depósito químico de vapor mejorado con plasma, depósito de capa atómica, depósito de baño químico, depósito de solución química, revestimiento por centrifugación, revestimiento por inmersión, evaporación, epitaxia de haces moleculares, pulverización catódica, chapado o galvanoplastia. Para producir membranas independientes, primero se puede depositar o formar una membrana sobre

una superficie de soporte, luego retirarla y finalmente montarla en un marco adecuado para el soporte mecánico de la membrana en una zona que rodea una parte independiente de la membrana. La membrana se puede unir al marco químicamente, mediante aplicación de presión (prensado), mediante calentamiento o enfriamiento, u otros métodos. Los métodos alternativos para producir membranas independientes incluyen eliminar solo una o más partes de la superficie de soporte sobre la que ha depositado o formado la membrana, dejando la membrana independiente una o más zonas, estando proporcionada la superficie de soporte restante por el marco de membrana. Las partes de la superficie de soporte se pueden eliminar mediante ataque químico en húmedo, ataque químico con plasma, ataque químico con iones reactivos, ataque químico por pulverización catódica, molienda iónica u otros procesos.

Los materiales de membrana adecuados de acuerdo con una o más realizaciones incluyen, pero no se limitan a, nitruro de silicio, silicio cristalino, dióxido de silicio, carbono amorfo, grafeno, metales, incluyendo berilio, polímeros, incluidos Formvar, Mylar, policarbonato, Etnom, Zythene, polipropileno, poliimida (Kapton), Prolene y Ultra-polyester, compuestos de múltiples materiales, como polímeros que contienen nanotubos de carbono o nanotubos de nitruro de boro, o compuestos en capas que comprenden múltiples materiales en capas.

La presión diferencial P necesaria para desviar una membrana rectangular delgada una distancia d en su centro se puede describir mediante la siguiente ecuación, con contribuciones de la tensión de tracción interna y la tensión de la membrana:

$$P = C_1 \frac{\sigma t}{a^2} d + C_2 \frac{E t}{a^4} d^3 \quad (1)$$

donde t y a son el espesor de la membrana y la mitad del ancho de la membrana, respectivamente, σ es la tensión de tracción interna, E es el módulo de Young y C_1 y C_2 son constantes que dependen de la geometría de la membrana y la relación de Poisson, v. véase Tabata, O., Kawahata, K., Sugiyama, S. e Igarashi, I., Mechanical property measurements of thin films using load-deflection of composite rectangular membranes, *Sensors and Actuators* 20, 135-141 (1989). Para una elección determinada de la composición de la membrana, la geometría de la membrana se puede ajustar para garantizar un desplazamiento de membrana apropiado a una presión diferencial práctica.

De acuerdo con una o más realizaciones, tal como se muestra en las FIGURAS 11A y 11B, las membranas flexibles 1140 pueden reforzarse agregando una malla 1145 de soporte de membrana que es más rígida que la membrana flexible 1140. Si la malla 1145 de soporte de membrana se usa en el lado 1105 de muestra del marco de membrana o estructura 1120 de marco de membrana, entonces el lado opuesto (el lado 1115 de sensor) permanece liso para un contacto cercano con el sensor (no mostrado). La malla 1145 de soporte de membrana puede interferir con las mediciones de la muestra, de modo que las mediciones solo se puedan realizar en las áreas abiertas de la malla 1145 de soporte de la membrana. De acuerdo con una o más realizaciones, la malla 1145 de soporte de membrana puede estar compuesta del mismo material que el marco 1120 de membrana. La malla 1145 de soporte de membrana se puede construir cuando la membrana independiente se fabrica eliminando de forma incompleta la superficie de soporte sobre la que se ha depositado o formado la membrana 1140 mediante ataque químico de la superficie de soporte, dejando atrás 1145 la malla de soporte de membrana. En otra realización, la malla 1145 de soporte de la membrana se puede depositar por separado después de la fabricación de la membrana y puede estar compuesta por un metal, óxido, semiconductor o cualquier otro material amorfo o cristalino que se pueda depositar con una resolución espacial y un espesor adecuados. Dado que la malla tiene zonas abiertas y puede estar compuesta por un material diferente, la malla puede ser más gruesa que la membrana y aun así permitir un desplazamiento adecuado bajo presión diferencial.

De acuerdo con el uso de un sistema sensor de una o más realizaciones, se pueden aplicar presiones diferenciales de menos de 100 kPa a la membrana como presión al lado de muestra de la membrana flexible o como vacío al lado de sensor de la membrana flexible. Este último no requiere sellar la parte superior del cartucho de muestras con una tapa, lo que puede interferir con la ruta óptica del sistema de formación de imágenes, aunque, tal como se ha descrito más arriba, la tapa de cartucho de muestras incluye una ventana adecuada para obtener imágenes de la luz emitida por el sensor. Un intervalo de presión de 0,1-50 kPa puede proporcionar una presión diferencial suficiente para evitar la sensibilidad a las fluctuaciones en la presión de la sala y se puede producir fácil y rápidamente con un aparato de bomba de vacío simple y de bajo costo. Un intervalo de presión de 1-10 kPa proporciona un equilibrio de baja fuerza en la estructura del marco de membrana (para minimizar la desviación del marco de membrana, en lugar del desplazamiento de la membrana) y facilidad de medición precisa de la presión, con fines de monitoreo y control.

De acuerdo con el uso de un sistema sensor de una o más realizaciones, también se pueden aplicar presiones diferenciales superiores a 100 kPa al lado de muestra de la membrana. Se puede formar una cámara presurizada con el lado de muestra de la membrana dentro de la cámara presurizada y el sensor fuera de la cámara. En este caso, la membrana se desplaza hacia el sensor bajo presión diferencial cuando la presión de la cámara aumenta por encima de la presión ambiental fuera de la cámara. Se pueden aplicar presiones diferenciales de 100-1000 kPa para lograr grandes desplazamientos de la membrana, incluyendo desplazamientos máximos a la presión diferencial máxima que se puede aplicar antes de que la membrana falle. En comparación con la aplicación de presión diferencial con una cámara de vacío en el lado de sensor de la membrana, la aplicación de presión diferencial con una cámara presurizada puede producir un desplazamiento adecuado incluso de una membrana rígida. Las membranas pueden ser rígidas debido al gran espesor, el tamaño lateral pequeño, el módulo de Young alto, la tensión de tracción interna alta, el uso de una malla de soporte de membrana u otras razones.

De acuerdo con una o más realizaciones, tal como se muestra en las FIGURAS 12A-12D, un casete 1200 de cartucho para utilizarlo con un sensor al realizar un ensayo incluye un soporte 1260 de marco de membrana que tiene dos o más aberturas, y una estructura 1220 de marco de membrana (que se muestra en las FIGURAS 12B y 12C) asegurada a un lado del soporte 1260 de marco de membrana, incluyendo la estructura 1220 de marco de membrana dos o más aberturas, que se muestran en las FIGURAS 12B y 12C, cada una coincidente al menos parcialmente con una abertura diferente en el soporte 1260 de marco de membrana. El casete 1200 de cartucho incluye además dos o más membranas flexibles 1240, cubriendo y sellando cada una de ellas una diferente de las dos o más aberturas en la estructura 1220 de marco de membrana para definir dos o más pocillos 1230 de muestra, teniendo cada membrana flexible 1240 un lado 1205 de muestra que soporta una muestra y un lado 1215 de sensor opuesto, estando cada membrana flexible 1240 configurada y dispuesta para ser desplazable en sentido opuesto a la estructura 1220 de marco de membrana de tal manera que la muestra se mueve a una posición más cercana a una superficie 1210 de sensor (mostrada en la FIGURA 12D) del sensor bajo una presión diferencial entre el lado 1205 de muestra y el lado 1215 de sensor de la membrana flexible 1240. La FIGURA 12A muestra una matriz de 96 membranas 1240 empacadas en un casete 1200 de cartucho que interactúa con un sensor, tal como un sensor de diamante NV, configurado para procesar múltiples muestras. El casete 1200 de cartucho está diseñado para garantizar la limpieza de la muestra al incluir la cubierta 1270 de casete de cartucho y la base 1280 de casete de cartucho, que se muestran en la FIGURA 12A. La cubierta 1270 de casete de cartucho y la base 1280 de casete de cartucho pueden estar hechos de cualquier material compatible con el procesamiento de muestras biológicas, tal como policarbonato moldeado.

El soporte 1260 de marco de membrana se asegura a la estructura 1220 de marco de membrana utilizando cualquier adhesivo adecuado para unir las dos partes. Esta capa de unión puede estar hecha de epoxi de dos partes (disponible comercialmente, por ejemplo, de MASTERBOND, Henkel, etc.), adhesivo activado por calor (por ejemplo, Nitto), material de unión como capas acrílicas (por ejemplo, 3M) o tejidos poliméricos mejorados o infundidos con adhesivos epoxi (por ejemplo, Henkel, MASTERBOND). En un ejemplo del proceso, la capa de unión, con un espesor en un intervalo entre 20 μm y 600 μm , se puede unir o aplicar primero al soporte 1260 de marco de membrana. La capa de unión se puede conformar o cortar previamente para permitir que las aberturas en el soporte 1260 de marco de membrana se alineen y tengan acceso a la cavidad por encima de la capa de la membrana en la estructura 1220 de marco de membrana. Usando un aparato de alineación o una plantilla de alineación, la estructura 1220 de marco de membrana se puede alinear con las posiciones de los pocillos de muestra (96 pocillos) y se puede presionar contra la capa de unión ya ensamblada en el soporte 1260 de marco de membrana. La unión se puede activar mediante una combinación de calor y presión para garantizar que el marco 1220 de membrana y el soporte 1260 de marco de membrana tiene un contacto razonable, un paralelismo aceptable y que se formará una unión unificada entre sí. El calor se puede aplicar elevando la temperatura de la plantilla de alineación que mantiene la estructura 1220 de marco de membrana en su lugar, o calentando todos los componentes, incluyendo la plantilla de alineación, la estructura 1220 de marco de membrana y el soporte 1260 de marco de membrana en un sistema de calentamiento por convección como un horno. El proceso de unión se puede completar normalmente a una temperatura en un intervalo entre 35 $^{\circ}\text{C}$ y 180 $^{\circ}\text{C}$.

El soporte 1260 de marco de membrana puede estar hecho de cualquier material rígido no magnético e impermeable, como alúmina con un espesor en un intervalo entre 0,25 mm y 5 mm, tal como 1 mm. La membrana flexible 1240 puede ser una membrana flexible de nitruro de silicio, una membrana flexible de silicio cristalino, una membrana flexible de dióxido de silicio, una membrana flexible de carbono amorfo, una membrana flexible de grafeno, una membrana flexible de nitruro de boro, una membrana flexible de metal o una membrana flexible de polímero. La membrana flexible 1240 se puede funcionalizar en el lado de muestra para interactuar con una muestra. La membrana flexible 1240 puede ser una membrana flexible de nitruro de silicio 1240 con un espesor en un intervalo entre 30 nm y 500 nm, tal como 200 nm. La estructura 1220 de marco de membrana puede incluir además una malla de soporte de membrana en la membrana flexible 1240 en el lado 1205 de muestra de la membrana flexible 1240, similar a la malla 1145 de soporte de membrana mostrada en las FIGURAS 11A-11B y descrita más arriba. La membrana flexible 1240 se puede desplazar a una distancia en el centro de la membrana flexible 1240 de hasta 100 μm , tal como 50 μm , en sentido opuesto a la estructura 1220 de marco de membrana. La membrana flexible 1240 se puede desplazar en sentido opuesto a la estructura 1220 de marco de membrana para que entre en contacto la superficie 1210 de sensor bajo la presión diferencial entre el lado 1205 de muestra y el lado 1215 de sensor de la membrana flexible 1240. La presión en el lado de sensor de la membrana flexible puede estar por debajo de la presión atmosférica, y la presión diferencial puede estar en un intervalo entre 0,1 kPa y 100 kPa, tal como entre 0,1 kPa y 50 kPa, o entre 1 kPa y 10 kPa. En algunas realizaciones, tal como se muestra en la FIGURA 12E, el casete 1200 de cartucho incluye además una tapa 1262 de cartucho de muestras configurada y dispuesta para cubrir la estructura 1220 de marco de membrana y el soporte 1260 de marco de membrana, incluyendo la tapa 1262 de cartucho de muestras una ventana 1264 sobre al menos una parte de cada membrana flexible 1240. En algunas de estas realizaciones, la tapa de cartucho de muestras puede incluir además una pluralidad de ventanas sobre una pluralidad de membranas flexibles. En determinadas realizaciones, la tapa de cartucho de muestras puede incluir además una entrada 1250 de gas para presurizar el lado 1205 de muestra de la membrana flexible 1240 a una presión diferencial en un intervalo entre 0,1 kPa y 1000 kPa, tal como entre 100 kPa y 1000 kPa. La FIGURA 12E también muestra la junta 1235, el pocillo de muestra 1230, los espaciadores 1225 alrededor del sensor 1210 y el sustrato 1212 de sensores.

Volviendo a las FIGURAS 12A-12C, el casete 1200 de cartucho incluye una guía 1265 de pipeta desmontable opcional que se superpone al soporte 1260 de marco de membrana. La guía 1265 de pipeta desmontable puede estar hecha

de cualquier material compatible con el procesamiento de muestras biológicas, tal como policarbonato moldeado. Como se muestra en las FIGURAS 12B y 12C, la guía 1265 de pipeta incluye un estante 1275 configurado para enganchar un reborde 1285 en una pipeta 1290 de carga de muestra que suministra una muestra, mostrada en la FIGURA 12C, en el pocillo 1230 de muestra. Las pipetas de carga de muestra con rebordes adecuados están disponibles comercialmente, por ejemplo Axygen número de pieza TF-L-R-S 420, (Corning, Nueva York). El estante 1275 se forma en la guía 1265 de pipeta en un moldeado u otro proceso. La guía 1265 de pipeta desmontable garantiza un posicionamiento repetible a una distancia constante entre la punta 1290 de pipeta y la membrana flexible 1240. La guía 1265 de pipeta desmontable garantiza así la integridad de la membrana flexible 1240 y mejora la facilidad de uso del casete 1200 de cartucho para un operador. Como se muestra en la FIGURA 12B, la guía 1265 de pipeta desmontable también incluye opcionalmente sistemas de sujeción 1245 de soporte de marco de membrana que aseguran el soporte 1260 de marco de membrana, las estructuras 1220 de marco de membrana y las membranas flexibles 1240 contra la base 1280 del casete de cartucho durante el transporte, mejorando así la integridad del conjunto. El casete 1200 de cartucho está diseñado para interactuar con pipetas individuales, pipetas multicanal y equipos de automatización de laboratorio estándar.

De acuerdo con una o más realizaciones, tal como se muestra en las FIGURAS 13A y 13B, un sistema sensor 1300 incluye un sensor que tiene una superficie 1310 de sensor, un cartucho 1301 de muestras que incluye una o más membranas flexibles 1340 y un marco de membrana o estructura 1320 de marco de membrana, incluyendo el marco de membrana una o más aberturas cubiertas por la o las membranas flexibles 1340 que definen uno o más pocillos 1330 para contener una o más muestras, teniendo la membrana flexible un lado 1305 de muestra que soporta la muestra y un lado 1315 de sensor opuesto, pudiendo el cartucho 1301 de muestras insertarse de manera extraíble en el sistema sensor 1300 de tal manera que el lado 1315 de sensor de la membrana flexible 1340 se sitúa arriba y queda orientado hacia la superficie 1310 de sensor, un mecanismo de desplazamiento (descrito más abajo) que se puede accionar para desplazar la membrana flexible 1340 hacia la superficie 1310 de sensor de modo que la muestra se mueva a una posición más cercana a la superficie 1310 de sensor, y un sistema óptico 1302 de formación de imágenes que detecta la luz emitida desde el sensor 1310. En determinadas realizaciones, el mecanismo de desplazamiento se puede configurar y disponer para crear una presión diferencial entre el lado 1305 de muestra y el lado 1315 de sensor de la membrana flexible 1340, y cada membrana flexible 1340 se puede configurar y disponer para que se pueda desplazar en sentido opuesto al marco 1320 de membrana para que entre en contacto con la superficie 1310 de sensor. En algunas realizaciones, la membrana flexible 1340 se puede dimensionar para que sea desplazable en sentido opuesto al marco 1320 de membrana para que entre en contacto con la superficie 1310 de sensor bajo la presión diferencial entre el lado 1305 de muestra y el lado 1315 de sensor de la membrana flexible 1340. En determinadas realizaciones, la superficie 1310 de sensor puede ser una superficie 1310 de sensor de diamante de nitrógeno-vacante (NV), y el sistema óptico 1302 de formación de imágenes forma una imagen de la fluorescencia emitida desde la superficie 1310 de sensor de diamante NV. La FIGURA 13B muestra una matriz de membranas 1340, como 8, 24 o 96 membranas 1340, empaquetadas en un cartucho 1301 de muestras que interactúa con el sistema óptico 1302 que está configurado para procesar múltiples muestras. Como se muestra en las FIGURAS 13A y 13B, en una realización, el sistema sensor 1300 también incluye un soporte 1360 de marco de membrana que está asegurado al marco 1320 de membrana. El soporte 1360 de marco de membrana está asegurado al marco 1320 de membrana utilizando materiales y métodos similares a los arriba descritos para asegurar el soporte 1260 de marco de membrana a la estructura 1220 de marco de membrana. El soporte 1360 de marco de membrana puede estar hecho de cualquier material rígido no magnético e impermeable, como alúmina con un espesor en un intervalo entre 0,25 mm y 5 mm, tal como 1 mm. La membrana flexible 1340 puede ser una membrana flexible de nitruro de silicio, una membrana flexible de silicio cristalino, una membrana flexible de dióxido de silicio, una membrana flexible de carbono amorfo, una membrana flexible de grafeno, una membrana flexible de nitruro de boro, una membrana flexible de metal o una membrana flexible de polímero. La membrana flexible 1340 se puede funcionalizar en el lado 1305 de muestra para interactuar con una muestra 1330. En algunas realizaciones, el cartucho 1301 de muestras puede incluir además una malla de soporte de membrana sobre la membrana flexible 1340 en el lado 1305 de muestra de la membrana flexible 1340, similar a la malla 1145 de soporte de membrana mostrada en las FIGURAS 11A-11B y descrita más arriba. En determinadas realizaciones, la membrana flexible 1340 puede ser una membrana flexible 1340 de nitruro de silicio con un espesor en un intervalo entre 30 nm y 500 nm, tal como 200 nm. La membrana flexible 1340 se puede desplazar a una distancia en el centro de la membrana flexible 1340 de hasta 100 μm , tal como 25 μm o 50 μm , en sentido opuesto al marco 1320 de membrana. La membrana flexible 1340 se puede desplazar en sentido opuesto al marco 1320 de membrana para que entre en contacto con la superficie 1310 de sensor bajo la presión diferencial entre el lado 1305 de muestra y el lado 1315 de sensor de la membrana flexible 1340. La presión diferencial puede estar en un intervalo entre 0,1 kPa y 1000 kPa, tal como entre 100 kPa y 1000 kPa.

Como se muestra en las FIGURAS 13A y 13B, en una realización, el soporte 1360 de marco de membrana se acopla de forma separable y forma un sello con una vejiga flexible 1365 que está dispuesta alrededor de un elemento óptico 1303 del sistema óptico 1302 que refleja la fluorescencia emitida desde la superficie 1310 de sensor de diamante NV. La vejiga flexible 1365 incluye una entrada 1370 de gas para presurizar el lado 1305 de muestra de la membrana flexible 1340. La vejiga flexible 1365 puede estar hecha de una variedad de compuestos de caucho de durómetro relativamente bajo, uretano fundido o termoplásticos moldeados por inyección lo suficientemente elásticos para formar un sello hermético cuando el elemento óptico 1303 se presiona contra el soporte 1360 de marco de membrana. Junto a la superficie 1310 de sensor están previstos espaciadores 1325 en el sustrato 1312 de sensores, para colocar el marco 1320 de membrana y evitar que la membrana flexible 1340 y el marco 1320 de membrana entren en contacto

con la superficie 1310 de sensor antes del accionamiento neumático. La superficie 1310 de sensor puede estar hundida por debajo del nivel de los espaciadores 1325, tal como se muestra en la FIGURA 13A, o a nivel con los espaciadores 1325, o sobresalir por encima de los espaciadores 1325 a una altura que no provoque la ruptura de la membrana flexible 1340. Como se muestra en la FIGURA 13B, el sistema óptico 1302 también incluye un tubo 1375 de eliminación de polvo que sopla aire limpio o nitrógeno a través de la superficie 1310 de sensor cuando el cartucho 1301 de muestras no está en su lugar.

Como se muestra en la FIGURA 14, en otra realización, un sistema sensor 1400 incluye además una tapa 1462 de cartucho de muestras colocada de forma separable sobre el marco de membrana o la estructura 1420 de marco de membrana y el soporte 1460 de marco de membrana, formando un sello con el marco 1420 de membrana y la junta 1435, incluyendo la tapa 1462 de cartucho de muestras una ventana 1464 sobre al menos una parte de la membrana flexible 1440 y el pocillo 1430 de muestra. En algunas realizaciones, la tapa de cartucho de muestras puede incluir una pluralidad de ventanas sobre una pluralidad correspondiente de membranas flexibles. La tapa de cartucho de muestras incluye además una entrada 1450 de gas para presurizar el lado 1405 de muestra de la membrana flexible 1440. En algunas realizaciones, la presión diferencial puede estar en un intervalo entre 0,1 kPa y 1000 kPa, tal como en un intervalo entre 100 kPa y 1000 kPa. El soporte 1460 de marco de membrana puede incluir una pluralidad de membranas 1440, tal como 96 membranas. En determinadas realizaciones, el soporte 1460 de marco de membrana puede estar hecho de alúmina con un espesor en un intervalo entre 0,25 mm y 5 mm, tal como 1 mm. La FIGURA 14 también muestra un elemento óptico 1403 del sistema óptico 1402 de formación de imágenes que forma una imagen de la fluorescencia emitida desde la superficie 1410 de sensor de diamante NV que está situado sobre el sustrato 1412 de sensores, entre los espaciadores 1425.

Una ventaja de la vejiga flexible 1365 mostrada en la FIGURA 13A sobre la tapa 1462 de cartucho de muestras mostrada en la FIGURA 14 es que la tapa 1462 de cartucho de muestras incluye la ventana 1464, además del elemento óptico 1403. La ventana 1464 adicional puede degradar la calidad de la imagen, aunque sea transparente a la luz emitida desde el sensor, tal como se ha descrito más arriba. La integración de la vejiga flexible 1365 con el elemento óptico 1303 también reduce la complejidad del sistema sensor 1300.

Como se muestra en las FIGURAS 15A y 15B, un ejemplo de un método 1500 para realizar un ensayo usando un sistema sensor de acuerdo con una o más realizaciones incluye depositar 1510 una muestra en un pocillo de muestra de un cartucho de muestras, estando definido el pocillo de muestra por una membrana flexible y un marco de membrana o estructura de marco de membrana que tiene una abertura sellada por la membrana flexible, teniendo la membrana flexible un lado de muestra que soporta la muestra y un lado de sensor opuesto, colocar 1520 el cartucho de muestras sobre una superficie de sensor de manera que el lado de sensor de la membrana flexible esté orientado hacia el superficie de sensor, desplazar 1530 la membrana flexible hacia la superficie de sensor de modo que la muestra se mueva a una posición más cercana a la superficie de sensor, y formar imágenes 1540 de la fluorescencia emitida desde el sensor con un sistema óptico de formación de imágenes cuando la muestra está en la posición más cercana a la superficie de sensor. El método 1500 puede incluir además funcionalizar 1501 el lado de muestra de la membrana flexible para interactuar con la muestra. Desplazar 1530 la membrana flexible puede incluir desplazar la membrana flexible a una distancia en el centro de la membrana flexible de hasta 100 μm , tal como hasta 50 μm . Desplazar 1530 la membrana flexible puede incluir desplazar la membrana flexible para que entre en contacto 1531 con la superficie de sensor. Como se muestra en la FIGURA 15B, desplazar 1530 la membrana flexible incluye establecer 1532 una presión diferencial entre el lado de muestra y el lado de sensor de la membrana flexible. Establecer 1532 la presión diferencial puede incluir evacuar 1533 el lado de sensor de la membrana flexible. La presión diferencial puede estar en un intervalo entre 0,1 kPa y 100 kPa, tal como entre 0,1 kPa y 50 kPa, o entre 1 kPa y 10 kPa. Evacuar 1533 el lado de sensor de la membrana flexible puede incluir acoplar 1534 el marco de membrana con una junta para formar un sello alrededor de un perímetro del marco de membrana. Establecer 1532 la presión diferencial puede incluir presurizar 1536 el lado de muestra de la membrana flexible. La presión diferencial puede estar en un intervalo entre 0,1 kPa y 1000 kPa, tal como entre 100 kPa y 1000 kPa. La presurización 1536 del lado de muestra de la membrana flexible puede incluir colocar 1538 de forma separable una tapa de cartucho de muestras sobre el marco de membrana para formar un sello con el marco de membrana, incluyendo la tapa de cartucho de muestras una ventana sobre al menos una parte de la membrana flexible. Presurizar 1536 el lado de muestra de la membrana flexible puede incluir acoplar 1539 de forma separable una vejiga flexible con el cartucho de muestras para formar un sello con el cartucho de muestras, estando dispuesta la vejiga flexible alrededor de un elemento óptico del sistema óptico de formación de imágenes.

Membrana de nitruro de silicio

El nitruro de silicio se puede utilizar para fabricar membranas robustas utilizando técnicas de fabricación de semiconductores estándar para la producción de gran volumen. Brevemente, se puede depositar una película delgada de nitruro de silicio sobre obleas de silicio mediante depósito de vapor químico a baja presión (LPCVD, por sus siglas en inglés). Véase Grant, A. W., Hu, Q.-H. y Kasemo, B., Transmission electron microscopy windows for nanofabricated structures, *Nanotechnology* 15, 1175-1181 (2004); y Ciarlo, D. R., Silicon nitride thin windows for biomedical microdevices, *Biomed. Microdevices* 4, 63-68 (2002). El proceso de depósito se puede optimizar para dar como resultado una tensión residual baja en la película de nitruro de silicio. El lado posterior de la oblea de silicio se puede estampar litográficamente para definir la membrana deseada y la geometría del marco, seguido de grabado anisótropo a lo largo de la (100) dirección del cristal de silicio. Este proceso da como resultado membranas independientes

soportadas por un marco de silicio con bordes inclinados a la mitad del ángulo tetraédrico α (mostrado en la FIGURA 3A) de 54,7°. La FIGURA 3B es una fotografía de una membrana 340 de nitruro de silicio de 2 mm x 2 mm de 1 μ m de espesor en un marco 320 de membrana de silicio de acuerdo con una o más realizaciones.

5 La resistencia y la desviación, también designadas en la presente memoria como desplazamiento o accionamiento, de las membranas de nitruro de silicio se han estudiado usando modelos teóricos de tensión de membrana (Ecuación 1) y comparación con membranas fabricadas. Véase Tabata, O., Kawahata, K., Sugiyama, S., e Igarashi, I., Mechanical property measurements of thin films using load-deflection of composite rectangular membranes. *Sensors and Actuators* 20, 135-141 (1989); y Maier-Schneider, D., Maibach, J., y Obermeier, E. A., New Analytical Solution for the Load-Deflection of Square Membranes. *J. Microelectromechanical Syst.* 4, 238-241 (1995). Para una membrana
10 cuadrada con $\nu = 0,25$, C_1 y C_2 son aproximadamente 3,45 y 2,48, respectivamente. Las FIGURAS 16A, 16B y 16C muestran gráficos de la desviación de membrana en función de la presión diferencial usando la Ecuación 1 para espesores de membrana t de 100 nm, 300 nm y 1000 nm, respectivamente. Las tres filas muestran gráficos para tres valores diferentes (0,5 mm, 1,5 mm y 5,0 mm) de la anchura media de membrana a (es decir, el tamaño lateral de la membrana es $2a$). Las tres líneas de cada gráfico corresponden a tres valores diferentes de tensión de tracción interna
15 σ ($\sigma_1 = 0$ MPa, $\sigma_2 = 200$ MPa, $\sigma_3 = 500$ MPa). Otras geometrías de membrana (circular, rectangular, etc.) muestran una desviación similar, con constantes C_1 y C_2 modificadas. La tensión de tracción interna σ depende del proceso de fabricación y se puede diseñar en un intervalo de 0 MPa a 1500 MPa con una precisión de 200 MPa o más. La tensión también puede ser negativa (es decir, tensión de compresión), lo que puede hacer que la superficie de la membrana se pliegue en ondas. La tensión de tracción positiva puede proporcionar una superficie de membrana más plana y lisa
20 en ausencia de presión diferencial. Una tensión de tracción baja, tal como $\sigma = 200$ MPa o menos, permite una mayor desviación de membrana a una presión diferencial baja, tal como se muestra en las FIGURAS 16A, 16B y 16C.

La geometría de la membrana, incluyendo la forma, el tamaño lateral y el espesor de la membrana, se puede ajustar para adaptarla a una medida determinada. El tamaño lateral de la membrana se puede determinar por el tamaño del campo
25 de visión de medición. La membrana puede ser más grande que el campo de visión del que se va a formar la imagen, de modo que el campo de visión no se reduce por la invasión del marco ni por la parte de la membrana en su perímetro que no está en contacto con el sensor. Se pueden usar membranas de nitruro de silicio con un tamaño lateral en un intervalo entre 0,1 mm y 30 mm para adaptarse a un amplio rango de tamaños de campo de visión. Se pueden usar membranas de gran tamaño (es decir, membranas con tamaños laterales más grandes de lo necesario para adaptarse al campo de visión) para aumentar la desviación de la membrana, tal como se muestra en las FIGURAS 16A-16C.

30 Alternativamente, se pueden usar membranas de tamaño mínimo o de tamaño menor que lo normal para evitar el contacto físico de la membrana desviada con estructuras distintas de la superficie de sensor. Por ejemplo, considérese un sensor de diamante NV cuadrado con dimensiones laterales de 2 mm x 2 mm. En este caso, la membrana se puede fabricar de modo que tenga un tamaño lateral inferior a 2 mm para garantizar que, cuando se coloca correctamente, la membrana desviada no tocará los bordes o las esquinas del sensor, ya que esto puede provocar una ruptura.

35 La forma de la membrana también se puede ajustar al campo de visión de medición. Para algunas tecnologías de fabricación de membranas, ciertas formas pueden ser más sencillas de producir, pueden producir una membrana con características más favorables, como tensión intrínseca o uniformidad, o pueden dar como resultado un perfil de membrana desviado que se adapta mejor al campo de visión de medición. En un sistema sensor ejemplar que utiliza membranas de nitruro de silicio fabricadas sobre marcos de membrana de oblea de silicio cristalino, las etapas del
40 proceso anisótropo utilizadas para la fabricación de membranas pueden favorecer una ventana cuadrada o rectangular en lugar de una ventana circular.

El espesor de la membrana se puede ajustar para lograr la desviación adecuada bajo una presión diferencial razonable (Ecuación 1), si la forma, el tamaño lateral y el material de la membrana se determinan de forma independiente para satisfacer las necesidades de la medición.

45 El proceso litográfico de eliminar el sustrato de silicio para crear la geometría de la membrana de nitruro de silicio se puede aumentar de escala fácilmente para producir 8, 24, 96 o cualquier número de membranas.

Ejemplo de un procedimiento de transferencia de muestra

Usando un sistema sensor de una o más realizaciones, la medición de muestras usando una membrana flexible de transferencia de muestras se puede realizar de la siguiente manera:

- 50 1. Cada una de una o más muestras se carga en una membrana flexible de transferencia de muestras, a razón de una muestra por membrana. En un solo cartucho de muestras puede haber muchas membranas en diferentes pocillos de muestra, por lo que se pueden cargar muchas muestras al mismo tiempo en el cartucho. Las muestras se pueden cargar como una suspensión líquida y dejarse secar sobre la membrana.
2. El cartucho de muestras se instala en el instrumento de medición.
- 55 3. Un pocillo de muestra del cartucho de muestras se ubica sobre el sensor moviendo una etapa XY a la posición adecuada.

4. El cartucho de muestras se baja para que la junta en el perímetro del cartucho se selle al sustrato de soporte de sensores. Cuando se comprime la junta, los espaciadores evitan que la membrana y el marco de membrana entren en contacto con el sensor, dejando un pequeño espacio entre la membrana y el sensor de aproximadamente 5-100 μm . El espacio entre el cartucho de muestras y el sustrato de soporte de sensores, incluido el espacio entre la membrana de transferencia de muestras y el sensor, se denomina aquí cámara de vacío.
5. La cámara de vacío se evacúa parcialmente bombeando en la línea de bomba de la cámara de vacío. La presión diferencial a través de la membrana desplaza ésta hacia el sensor de manera que la membrana entra en contacto con el sensor. Este proceso se denomina en la presente memoria accionar la membrana. La presión de la cámara de vacío se elige de modo que sea lo suficientemente baja para que el área de contacto con el sensor sea mayor que el campo de visión de medición, pero no tan baja como para que la presión diferencial a través de la membrana haga que la membrana reviente.
6. La medición de la muestra continúa con la membrana en contacto con el sensor, manteniendo la presión lo suficientemente constante como para mantener el contacto entre la membrana y el sensor a través del campo de visión de medición.
7. Después de la medición, la cámara de vacío se ventila y la membrana se relaja hasta un estado de desplazamiento mínimo. Esto se denomina en la presente memoria liberar la membrana.
8. La etapa de muestra traslada el cartucho de muestras verticalmente alejándolo del sensor, abriendo el sello de la junta.
9. Las etapas 3 a 8 se repiten para un pocillo de muestra diferente.

El instrumento de medición puede contener múltiples sensores para permitir que múltiples membranas de transferencia de muestras en múltiples pocillos de muestra del cartucho de muestras interactúen con múltiples sensores en paralelo al mismo tiempo en una sola etapa de accionamiento de membrana. El accionamiento de membranas en paralelo con menos etapas totales de accionamiento de membrana puede reducir la complejidad del instrumento de medición y el aparato de accionamiento de membrana de transferencia de muestras, y reducir la cantidad de veces que se acciona una membrana individual para reducir la posibilidad de degradación o fallo de la membrana. Las mediciones de múltiples muestras en múltiples membranas conectadas a múltiples sensores se pueden realizar una tras otra en serie o simultáneamente en paralelo.

Una vez medidas todas las muestras, el cartucho de muestras se puede retirar del instrumento de medición. El cartucho se puede almacenar para futuras mediciones, limpiar para retirar las muestras de modo que se puedan cargar nuevas muestras, utilizando un procedimiento de limpieza adecuado para las mediciones previstas, o desechar, según corresponde en el caso de los cartuchos de muestras desechables de un solo uso. Un cartucho de muestras desechable puede incluir la junta de sellado, la ventana de formación de imágenes, la línea de bomba u otros componentes implicados en la instalación del cartucho de muestras o en la conexión de una o más muestras soportadas por membrana con el sensor, de modo que todos los componentes del cartucho de muestras sean desechables. Un cartucho de muestras desechable se puede separar fácilmente de cualquier parte o componente del instrumento de medición sin contaminación, degradación u otro compromiso del instrumento de medición y la capacidad de realizar mediciones futuras.

Ejemplo de un procedimiento de carga de muestras

La membrana y el sensor deben mantenerse libres de polvo y otras partículas que puedan interferir en el contacto cercano de la membrana con la superficie de sensor. Como se muestra en la FIGURA 17A, antes de su uso, el cartucho 1700 de muestras se puede almacenar con una cubierta protectora 1770A-B para evitar la contaminación. Durante la carga de muestras, el lado 1705 de muestra de la membrana flexible 1740 se expone retirando la cubierta protectora 1770A, tal como indica la flecha mostrada en la FIGURA 17A, para permitir que la muestra 1730 sea cargada sobre la superficie 1740 de membrana, mientras que el lado 1715 de sensor de la membrana flexible 1740 permanece protegido por la cubierta 1770B, tal como se muestra en la FIGURA 17B. El lado 1715 de sensor de la membrana flexible 1740 queda finalmente expuesto retirando la cubierta protectora 1770B, tal como indica la flecha mostrada en la FIGURA 17C, justo antes de que el cartucho 1700 de muestras sea insertado en el instrumento para la medición, o durante la inserción. Alternativa o adicionalmente se pueden emplear otras estrategias para mitigar el polvo o garantizar de otro modo la limpieza de las superficies de sensor y de membrana. Éstas incluyen filtración de aire, mantenimiento de presión positiva en la zona del instrumento de medición que contiene el sensor durante los momentos en los que el cartucho de muestras no está en su lugar, mitigación o atrapamiento de polvo por fuerzas electrostáticas, uso de chorros de aire o gas para eliminar el polvo acumulado, y limpieza del sensor con un trapo con o sin disolventes.

Las muestras que comprenden suspensiones líquidas de partículas magnéticas u otro material magnético se pueden optimizar para la dispersión sobre la membrana de transferencia de muestras. Además, la superficie de la membrana de transferencia de muestras se puede tratar o revestir químicamente para garantizar una interacción específica con la muestra líquida. Este tratamiento incluye la aplicación de revestimientos hidrófilos o hidrófobos para diseñar características de humectación específicas de la muestra. Además, o alternativamente, el lado de muestra de la

membrana se puede funcionalizar con una matriz o patrón para ayudar a que las partículas magnéticas se sequen con el mismo patrón. Los patrones, cuadrículas o disposiciones irregulares se pueden aplicar con una impresora láser. Los patrones, cuadrículas o disposiciones irregulares pueden ayudar a identificar más rápidamente dímeros o monómeros y pueden reducir o prevenir eventos de unión falsa que se pueden producir durante el proceso de secado.

- 5 Además de la dispersión de muestras, los revestimientos de membrana pueden ayudar a las aplicaciones que son sensibles a las interacciones de la superficie. Los parches hidrófobos podrían atraer burbujas de aire, que podrían influir negativamente en el procesamiento y la medición de la muestra. Los parches hidrófobos también podrían llevar una carga que atraiga a los componentes de la muestra, incluyendo los ácidos nucleicos, lo que afectaría la exactitud y la precisión de las mediciones relacionadas.
- 10 En el uso de un sistema sensor de una o más realizaciones, un tampón de suspensión de muestra puede incluir sales, tensioactivos, proteínas u otros componentes para ayudar a evitar o promover la agregación de partículas magnéticas. La superficie de la membrana de transferencia de muestras se puede funcionalizar, texturizar, deformar o modificar de otro modo durante la carga de la muestra para influir en la dispersión, la agregación, la orientación, la interacción u otros procesos y propiedades de la muestra que pueden influir en la medición magnética posterior.
- 15 En el uso de un sistema sensor de una o más realizaciones, durante y/o después de la carga en la membrana de transferencia de muestras se pueden aplicar a la muestra campos magnéticos, campos eléctricos, temperatura, presión, tensión, luz y otros tratamientos de aplicación externa para inducir una respuesta en la medición magnética posterior. Estos tratamientos pueden ser estáticos o variables en el tiempo y se pueden aplicar uniformemente sobre la muestra o de manera espacialmente variable. Los ejemplos incluyen: (1) magnetización de la muestra después de cargarla con un campo magnético aplicado en una dirección y una magnitud particulares, o una secuencia de campos magnéticos aplicados; (2) orientación o agregación inducida de partículas magnéticas en una suspensión de muestra líquida mediante la aplicación de un campo magnético; (3) calentamiento y/o enfriamiento de la muestra; y (4) agitación mecánica de la muestra induciendo el desplazamiento de la membrana.
- 20

Ejemplo de un procedimiento de accionamiento de membrana

- 25 Las FIGURAS 18, 19 y 20 ilustran esquemáticamente varios mecanismos de desplazamiento que incluyen sistemas de vacío para accionar neumáticamente la membrana 340 de transferencia de muestras contra la superficie 310 de sensor del cartucho 300 de muestras (mostrado en la FIGURA 3A) de acuerdo con una o más realizaciones.

Los mecanismos 1800 y 1900 de desplazamiento mostrados en las FIGURAS 18 y 19 incluyen un regulador 1810, 1910 de vacío, respectivamente, que está controlado activamente por un controlador 1820, 1920, respectivamente, para establecer la presión de la cámara de vacío. En el mecanismo 1800 de desplazamiento mostrado en la FIGURA 18, el regulador de vacío 1810 está en línea con la bomba 1830 de vacío.

30

En el mecanismo 2000 de desplazamiento mostrado en la FIGURA 20, un regulador 2010 de vacío en línea mantiene una presión de vacío constante. La cámara de vacío se bombea a esta presión de vacío y luego se ventila controlando activamente la válvula 2040 de accionamiento y la válvula de ventilación 2050, respectivamente, para accionar y posteriormente liberar la membrana 340.

35

Las FIGURAS 21 y 22 ilustran esquemáticamente varios mecanismos de desplazamiento que incluyen sistemas de presión positiva para accionar neumáticamente la membrana 740 de transferencia de muestras contra la superficie 710 de sensor del cartucho 700 de muestras (mostrado en la FIGURA 7) de acuerdo con una o más realizaciones.

El mecanismo 2100 de desplazamiento mostrado en la FIGURA 21 incluye un regulador 2110 de presión que es controlado activamente por el controlador 2120 para establecer la presión del cartucho de muestras.

40

En el mecanismo 2200 de desplazamiento mostrado en la FIGURA 22, un regulador 2210 de presión en línea mantiene una presión constante. El cartucho de muestras se presuriza a esta presión y luego se ventila controlando activamente la válvula 2240 de accionamiento y la válvula 2250 de ventilación, respectivamente, con el controlador 2220, para accionar y posteriormente liberar la membrana 740.

45 Al desplazar la membrana hacia la superficie plana del sensor de diamante, el perfil espacial de la membrana desplazada se puede deducir de la interferencia de la luz reflejada desde las superficies del diamante y de la membrana. Un método consiste en iluminar el sensor de diamante por detrás con luz de banda estrecha, de modo que la luz pase a través del diamante, el espacio sobre el diamante y luego la membrana por encima de éste antes de ser captada por un sistema de formación de imágenes como un microscopio óptico. La luz reflejada desde las superficies de la membrana y del diamante interfiere para producir franjas oscuras y claras en la imagen donde la interferencia es destructiva o constructiva, respectivamente. Las franjas oscuras consecutivas se producen cuando el espacio entre el diamante y la membrana ha cambiado en un múltiplo medio entero de la longitud de onda óptica.

50

La FIGURA 23 ilustra varias imágenes ópticas de luz de banda estrecha (longitud de onda 651 ± 4 nm) transmitida a través de un sensor de diamante y una membrana de nitruro de silicio de 500 nm de espesor. Estas imágenes en franjas se pueden usar para caracterizar la zona de contacto e identificar lugares en los que el espacio entre la membrana y el sensor de diamante puede ser lo suficientemente grande como para influir significativamente en la

55

formación de imágenes magnéticas de la muestra en ese lugar. La secuencia (1)-(16) en la FIGURA 23 corresponde a un aumento monótono de la presión diferencial de membrana de cero a 10 kPa. La imagen se enfoca en la superficie de sensor de diamante. Las superficies de sensor y de membrana producen reflejos. Son visibles franjas de interferencia claras y oscuras donde estos reflejos interfieren de manera constructiva y destructiva, respectivamente, dependiendo del espacio de aire local entre la membrana y el sensor. El perfil de la membrana se puede deducir de las franjas. Cuando una partícula permanece entre la membrana y el sensor de diamante, se ve una mancha oscura.

Se pueden usar espaciadores alrededor del sensor de diamante para garantizar que la membrana y su marco no choquen con el sensor de diamante cuando se baja el cartucho de muestras para sellar la cámara de vacío. Se puede diseñar un espacio de 5 a 100 μm usando piezas mecanizadas con tolerancias razonables. Dicha separación está dentro de un intervalo de desviación razonable para una membrana delgada bajo una presión diferencial de 1-10 kPa, tal como se muestra en las FIGURAS 16A-16C.

De acuerdo con una o más realizaciones, los espaciadores se pueden diseñar de manera que la superficie de sensor resalte o sobresalga por encima de la superficie definida por los espaciadores, de modo que la membrana haga contacto con la superficie de sensor cuando el marco de membrana se pone en contacto con los espaciadores, antes de aplicar una presión diferencial. Posteriormente se puede aplicar una presión diferencial para desplazar toda la membrana más contra el sensor con el fin de aumentar el área de contacto. Si el sensor resalta o sobresale por encima de los espaciadores, se reduce el desplazamiento de la membrana necesario para lograr un área de contacto determinada, lo que permite el accionamiento de la membrana con una presión diferencial reducida. Sin embargo, si la superficie de sensor sobresaliente puede entrar en contacto con la membrana antes de que el marco de membrana entre en contacto de forma segura con los espaciadores, un pequeño movimiento lateral de la membrana con respecto al sensor puede dañar la membrana a medida que se coloca en su posición. La posibilidad de daño se reducirá asegurándose de que la membrana y el marco de membrana entren en contacto suavemente a lo largo de la dirección normal a la superficie de sensor. Además, el tamaño lateral de la membrana debe ser lo suficientemente mayor que la superficie de sensor para evitar que el borde del sensor dañe la membrana en el punto de contacto. Los bordes del sensor pueden estar redondeados, biselados o conformados de otra forma para reducir la concentración de tensión mecánica en la membrana provocada por el contacto con el sensor.

Ejemplo de un procedimiento de formación de imágenes magnéticas de muestras soportadas por membrana

La membrana de transferencia de muestras no magnética no influye en el campo magnético producido por la muestra. La muestra no se refleja "a través" de la membrana, sino que los campos magnéticos producidos por la muestra atraviesan la membrana sin ser perturbados y se reflejan en la superficie de detección del diamante. Como tal, no hay distorsión de la imagen magnética debido simplemente a la presencia de la membrana. Sin embargo, dado que la muestra está soportada mecánicamente por la membrana, las variaciones en la posición y el espesor de la membrana pueden resultar en variaciones en la distancia relativa entre la muestra y el sensor de diamante, con la correspondiente variación en la fuerza y el perfil espacial del campo magnético en la superficie de sensor. Esta variación es evidente en las FIGURAS 24a-24e, que muestran una disminución de la magnitud y un patrón espacial más amplio para el campo magnético producido al aumentar la separación entre la muestra y la superficie de sensor.

Las FIGURAS 24a-24e muestran partes de imágenes magnéticas obtenidas con formación de imágenes magnéticas de diamante de campo amplio, que muestran señales dipolares de partículas magnéticas magnetizadas horizontalmente. (a) Partículas depositadas directamente sobre el sensor de diamante; (b-e) cuatro imágenes de un conjunto coherente de tres partículas soportadas por una membrana de 500 nm con separaciones de membrana de diamante de (b) 0 μm , (c) 3 μm , (d) 6 μm , (e) 30 μm . El campo de visión es de 45 μm . Escala de grises: (a-c) 36 μT ; (d-e) 11 μT . Las imágenes en (d-e) están filtradas espacialmente para mayor claridad. La FIGURA 24(f) es un gráfico de distancias de dipolo extraídas de ajustes a un modelo de dipolo de ≈ 100 imágenes de partículas, en comparación con distancias determinadas independientemente del enfoque de la imagen. Los puntos corresponden, en orden ascendente, a imágenes que contienen las partes mostradas en las FIGURAS 24(a-d), respectivamente. Las distancias ajustadas superan las distancias reales debido al espesor finito de la capa de detección rica en NV y la resolución espacial finita.

Ejemplo de un procedimiento de transmisión óptica a través de una membrana de transferencia de muestras

Cuando la membrana de transferencia de muestras está colocada sobre un sensor de diamante, la luz de la señal de imagen magnética (fluorescencia del centro NV desde el sensor de diamante) pasa a través de la membrana antes de ser recogida por una lente de objetivo. Esta luz de señal se refleja desde las superficies superior e inferior de la membrana. La luz de señal reflejada también se refleja nuevamente desde la superficie de sensor de diamante, y así sucesivamente.

La interferencia resultante puede ser constructiva o destructiva (más o menos transmisión de señal de luz, respectivamente) según el índice de refracción de la membrana, el espesor de la membrana y el tamaño del espacio de aire entre la membrana y el sensor de diamante. Las variaciones en estos parámetros sobre el campo de visión de formación de imágenes pueden causar variaciones en la intensidad de la luz de señal y, en consecuencia, una degradación localizada de la sensibilidad de la formación de imágenes magnéticas.

Para una longitud de onda óptica dada, es posible elegir un espesor de membrana para maximizar la interferencia

- 5 constructiva, de modo que se produzca una reflexión insignificante desde la membrana. Esta es una técnica común para la construcción de revestimientos ópticos no reflectantes. Sin embargo, dado que el espectro de emisión del centro NV es bastante amplio (abarca más de 100 nm), controlar solo el espesor de la membrana puede proporcionar solo una supresión imperfecta de la reflexión de la luz de señal. Por ejemplo, una membrana de nitruro de silicio con un índice de refracción de aproximadamente 2,1 en el intervalo de longitudes de onda del espectro visible de 650-800 nm garantizará que más del 90 % de la luz de señal se transmita a través de la membrana.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema sensor (1300, 1400) que comprende:
- (a) un sensor que tiene una superficie (1310, 1410) de sensor;
 - 5 (b) un cartucho (1301) de muestras que incluye una o más membranas flexibles (1340, 1440) y un marco (1320, 1420) de membrana, incluyendo el marco de membrana una o más aberturas cubiertas por una o más membranas flexibles (1340, 1440) que definen uno o más pocillos (1330, 1430) para contener una o más muestras, teniendo la membrana flexible (1340, 1440) un lado (1305, 1405) de muestra para soportar la muestra y un lado (1315, 1415) de sensor opuesto, pudiendo insertarse el cartucho (1301) de muestras de forma extraíble en el sistema sensor de manera que el lado (1315, 1415) de sensor de la membrana flexible se coloca por encima y queda orientado hacia la superficie (1310, 1410) de sensor;
 - 10 (c) un mecanismo de desplazamiento que se puede accionar para desplazar la membrana flexible (1340, 1440) hacia la superficie (1310, 1410) de sensor de modo que la muestra se mueva a una posición más cercana a la superficie (1310, 1410) de sensor; y
 - (d) un sistema óptico (1302, 1402) de formación de imágenes para detectar la luz emitida desde el sensor.
- 15 2. El sistema de la reivindicación 1, en el que el mecanismo de desplazamiento está configurado y dispuesto para crear una presión diferencial entre el lado (1305, 1405) de muestra y el lado (1315, 1415) de sensor de la membrana flexible (1340, 1440), y la membrana flexible (1340, 1440) está configurada y dispuesta para ser desplazable en sentido opuesto al marco de membrana para que entre en contacto con la superficie (1310) de sensor.
- 20 3. El sistema de la reivindicación 2, en el que la membrana flexible (1340, 1440) está dimensionada para poder desplazarla en sentido opuesto al marco de membrana para que entre en contacto con la superficie de sensor bajo la presión diferencial entre el lado (1305, 1405) de muestra y el lado de sensor (1315, 1415) de la membrana flexible (1340, 1440).
- 25 4. El sistema de la reivindicación 1, en el que la superficie (1310, 1410) de sensor es una superficie (1310, 1410) de sensor de diamante nitrógeno-vacante, NV, y el sistema óptico (1302, 1402) de formación de imágenes está configurado para generar imágenes de la fluorescencia emitida desde la superficie (1310, 1410) de sensor de diamante NV.
5. El sistema de la reivindicación 1, en el que la membrana flexible (1340, 1440) está funcionalizada en el lado (1305, 1405) de muestra para interactuar con una muestra.
- 30 6. El sistema de la reivindicación 1, en el que la membrana flexible (1340, 1440) es una membrana flexible de nitruro de silicio, una membrana flexible de silicio cristalino, una membrana flexible de dióxido de silicio, una membrana flexible de carbono amorfo, una membrana flexible de grafeno, una membrana flexible de nitruro de boro, una membrana flexible de metal o una membrana flexible de polímero.
7. El sistema de la reivindicación 1, en el que la membrana flexible (1340, 1440) se puede desplazar a una distancia en el centro de la membrana flexible (1340, 1440) hasta:
- A) 100 μm de distancia del marco de membrana; o
 - 35 B) 50 μm de distancia del marco de membrana.
8. El sistema de la reivindicación 1, en el que el cartucho de muestras incluye además una tapa (1462) de cartucho de muestras configurada y dispuesta para superponerse al marco (1420) de membrana, incluyendo la tapa (1462) de cartucho de muestras una ventana (1464) sobre al menos una parte de la membrana flexible (1440).
- 40 9. El sistema de la reivindicación 8, en el que la tapa (1462) de cartucho de muestras incluye una pluralidad de ventanas sobre una pluralidad correspondiente de membranas flexibles.
10. El sistema de la reivindicación 8, en el que la tapa (1462) de cartucho de muestras incluye además una entrada (1450) de gas para presurizar el lado de muestra de la membrana flexible (1440).
- 45 11. El sistema de la reivindicación 1, en el que el cartucho (1301) de muestras incluye además un soporte (1360, 1460) de marco de membrana asegurado al marco (1320, 1420) de membrana en el lado (1305, 1405) de muestra de la membrana flexible (1340, 1440).
- 50 12. El sistema de la reivindicación 11, en el que el sistema óptico (1302) de formación de imágenes incluye además una vejiga flexible (1365) alrededor de un elemento óptico (1303) del sistema óptico (1302) de formación de imágenes y una entrada (1370) de gas para presurizar el lado (1305) de muestra de la membrana flexible (1340), estando la vejiga flexible (1365) configurada y dispuesta para acoplarse de manera separable y formar un sello con el soporte (1360) de marco de membrana.

13. El sistema de la reivindicación 10 o 12 cuando depende de la reivindicación 2, en el que la presión diferencial está en un intervalo entre 0,1 kPa y 1000 kPa.
14. El sistema de la reivindicación 11, en el que el soporte (1360, 1460) de marco de membrana está asegurado a una pluralidad de marcos (1320, 1420) de membrana.
- 5 15. El sistema de la reivindicación 14, en el que la pluralidad de marcos de membrana comprende 96 marcos de membrana.
16. El sistema de la reivindicación 15, en el que el soporte (1360, 1460) de marco de membrana está hecho de alúmina con un espesor en un intervalo entre 0,25 mm y 5 mm.

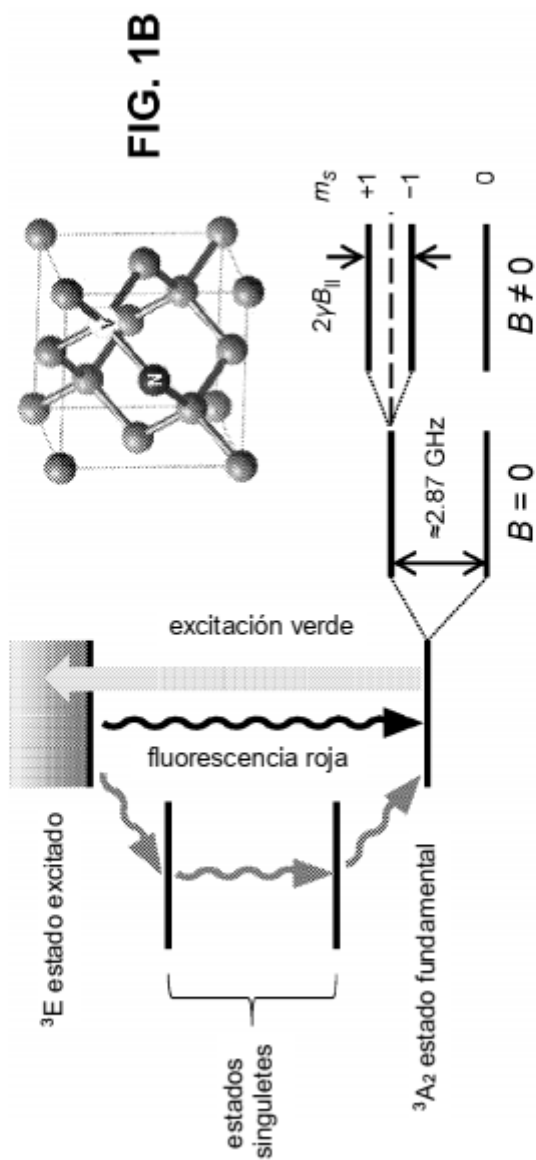


FIG. 1A

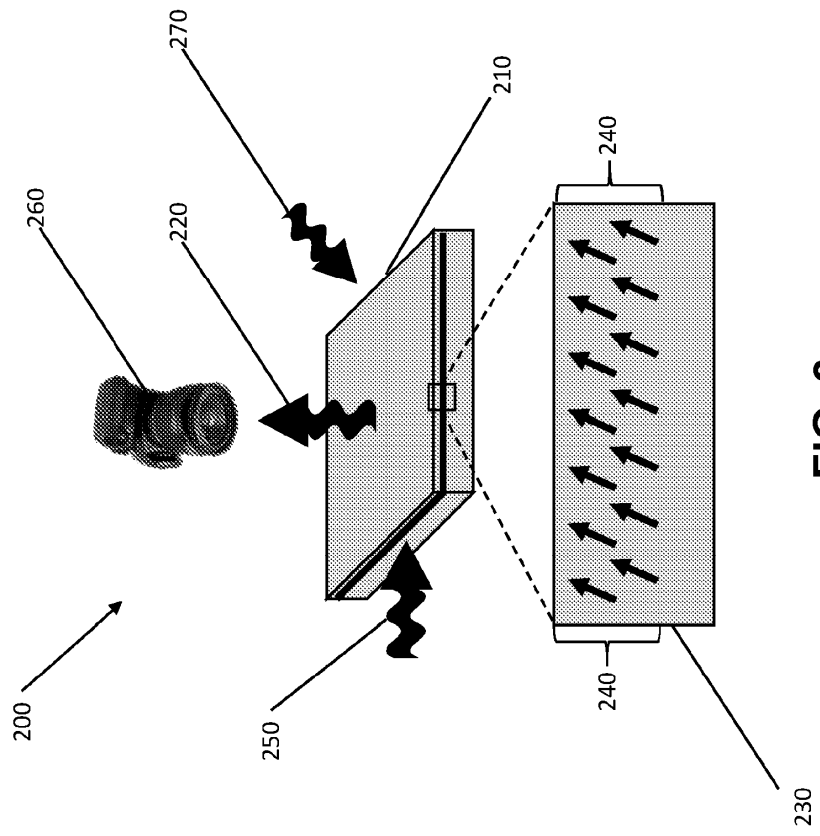


FIG. 2

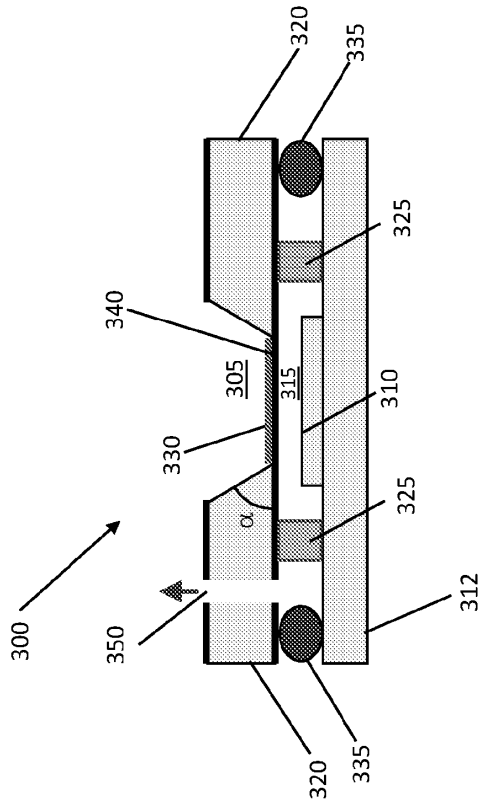


FIG. 3A

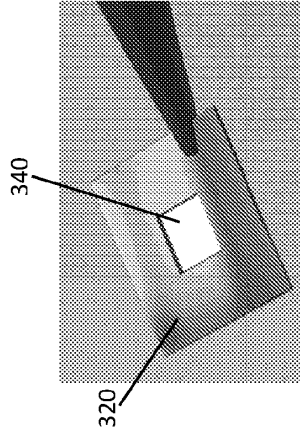


FIG. 3B

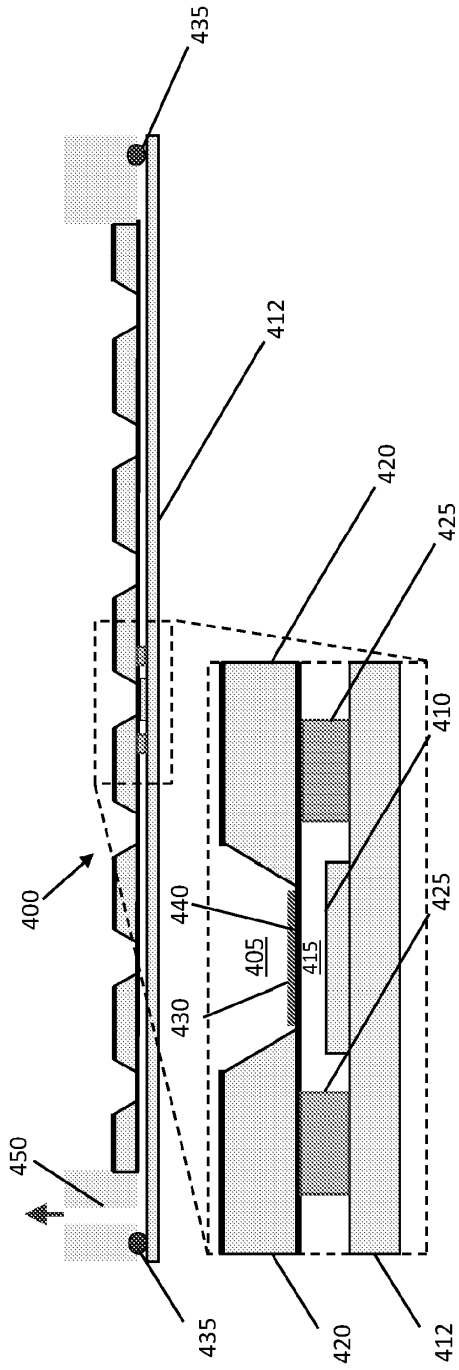


FIG. 4A

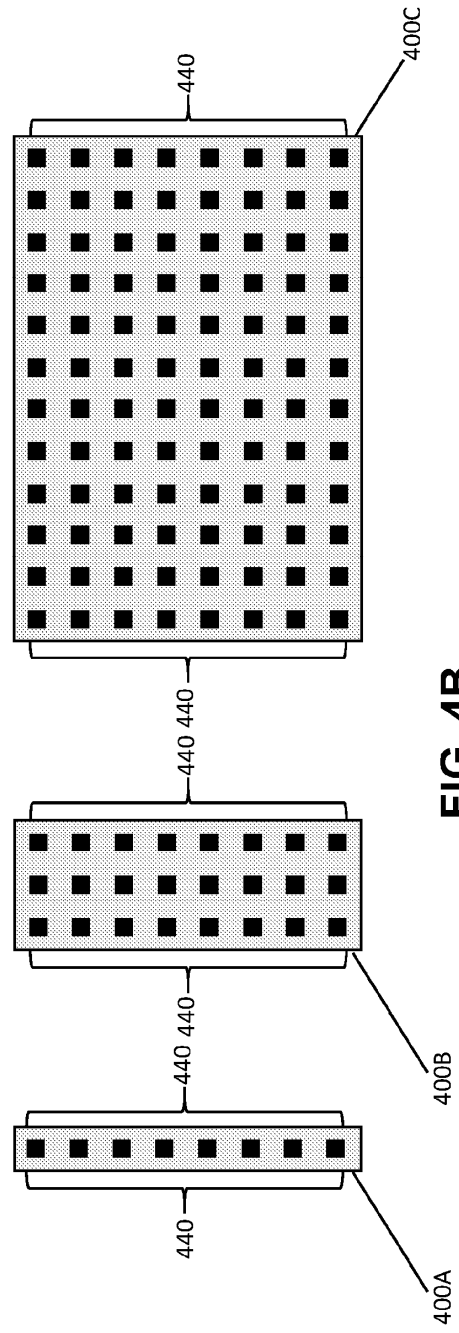


FIG. 4B

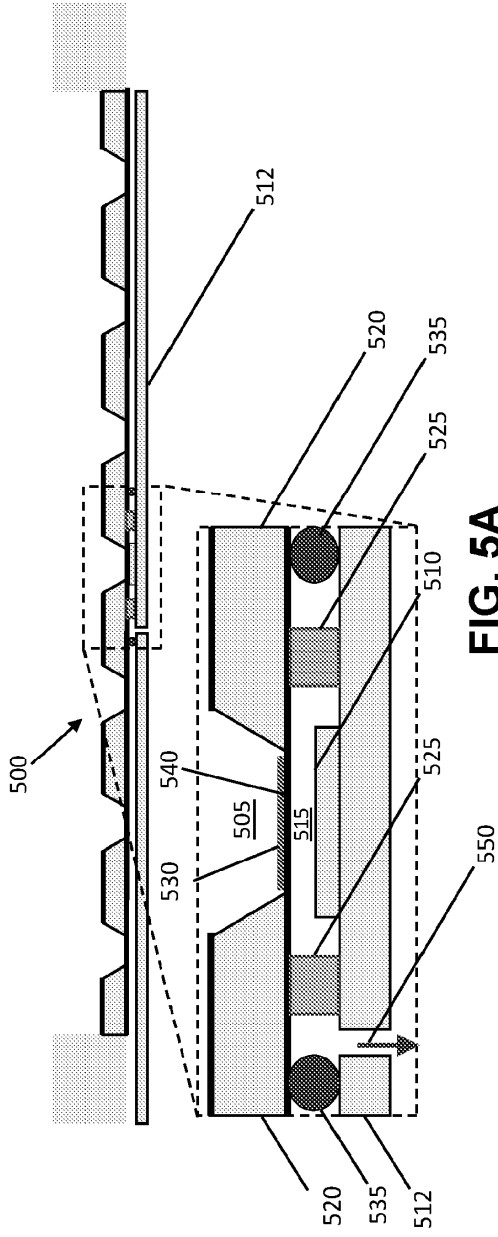


FIG. 5A

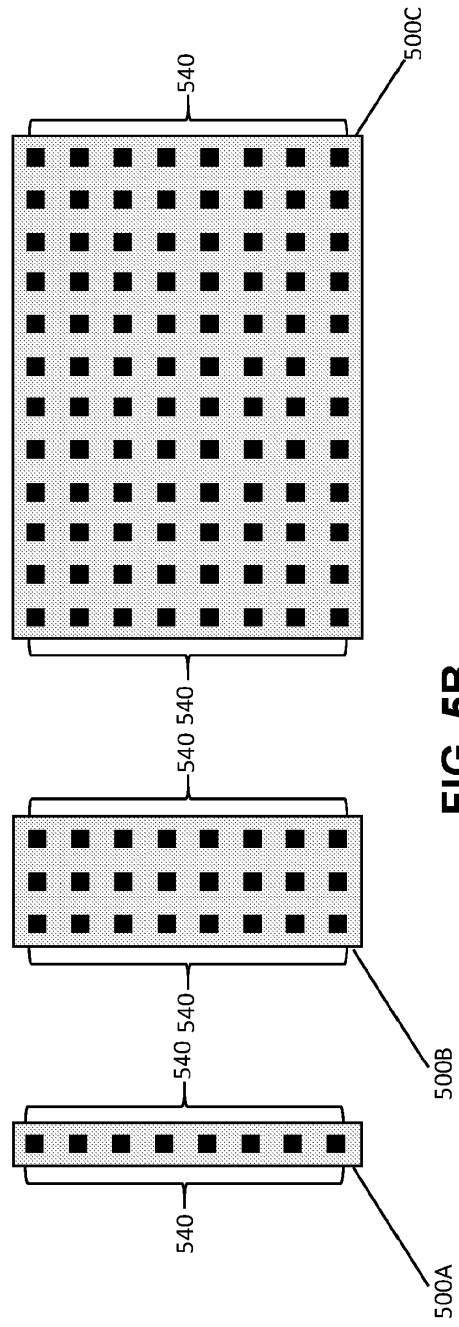


FIG. 5B

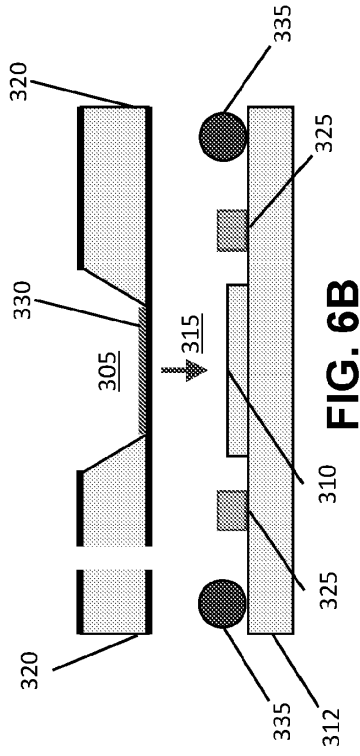


FIG. 6B

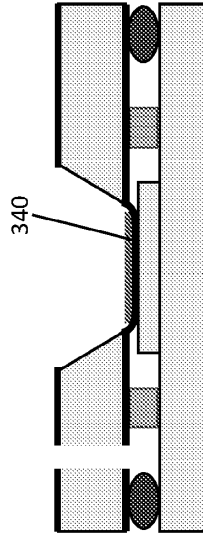


FIG. 6D

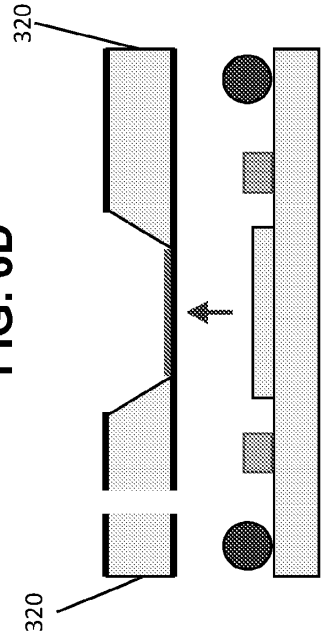


FIG. 6F

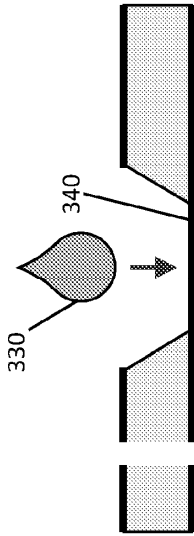


FIG. 6A

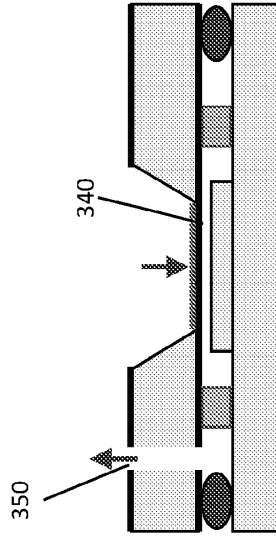


FIG. 6C

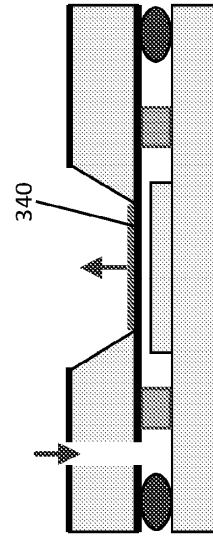


FIG. 6E

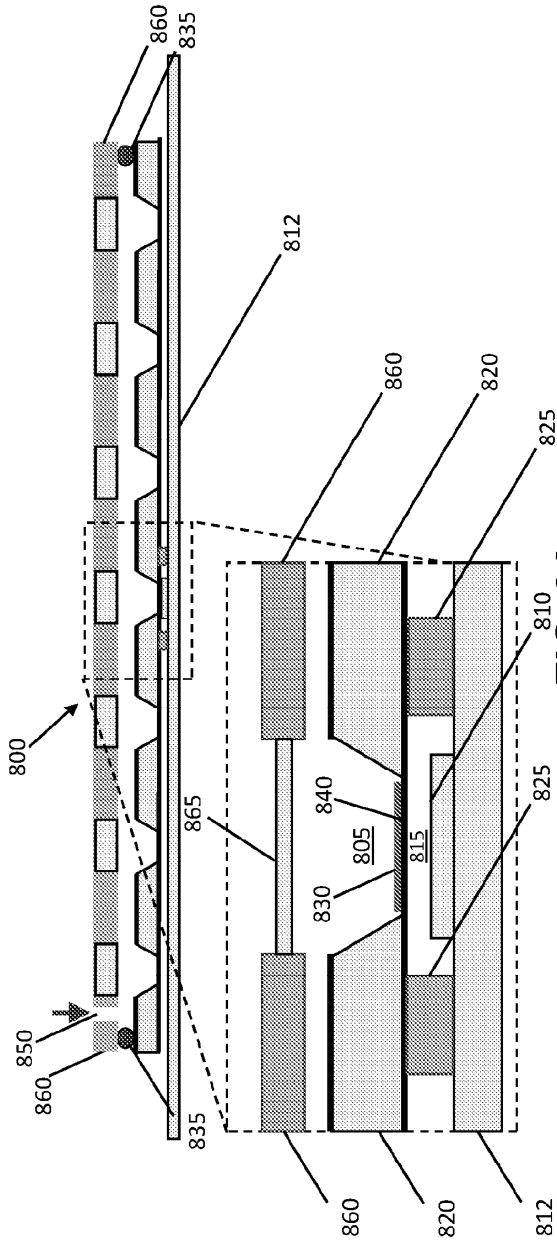


FIG. 8A

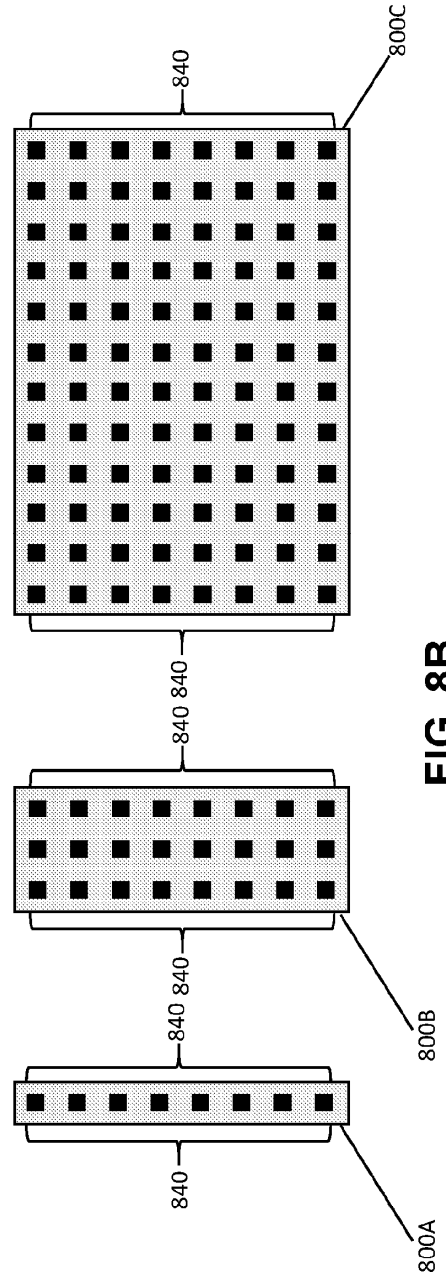


FIG. 8B

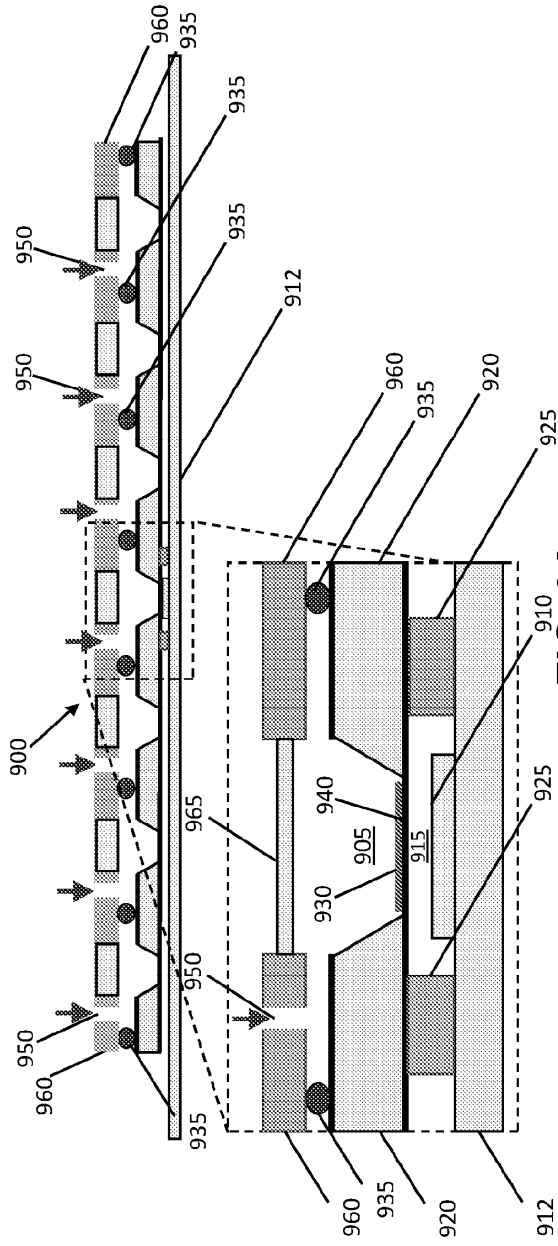


FIG. 9A

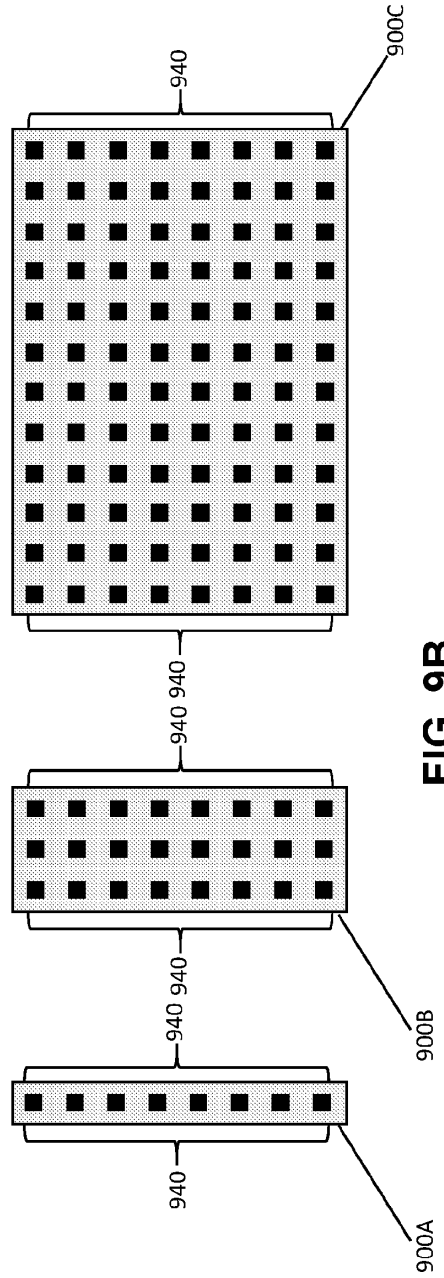


FIG. 9B

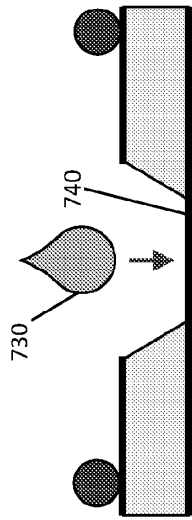
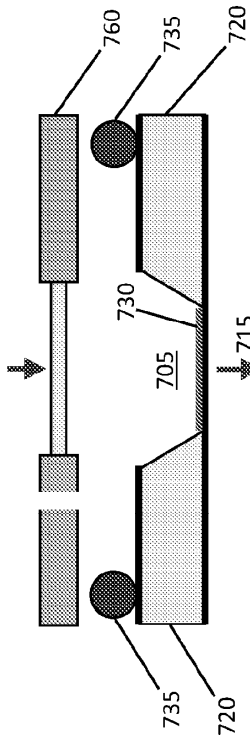


FIG. 10A

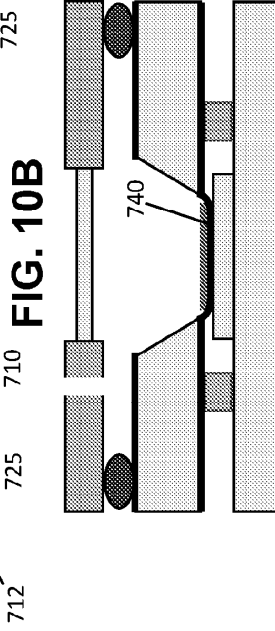


FIG. 10B

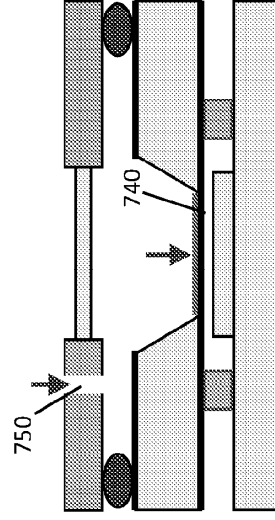


FIG. 10C

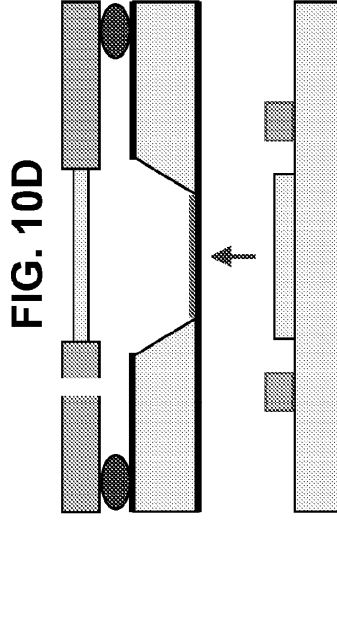


FIG. 10D

FIG. 10E

FIG. 10F

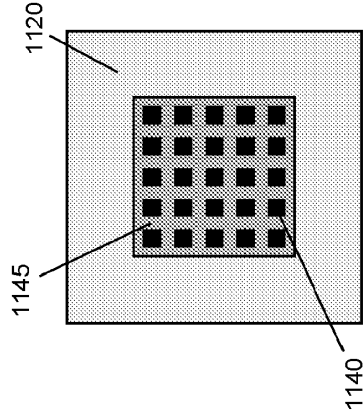


FIG. 11B

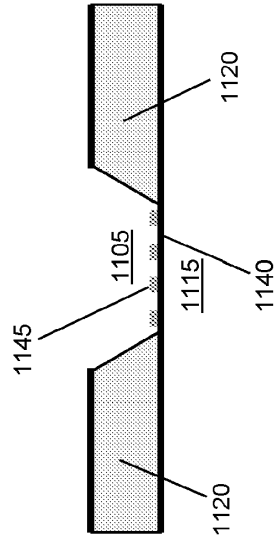


FIG. 11A

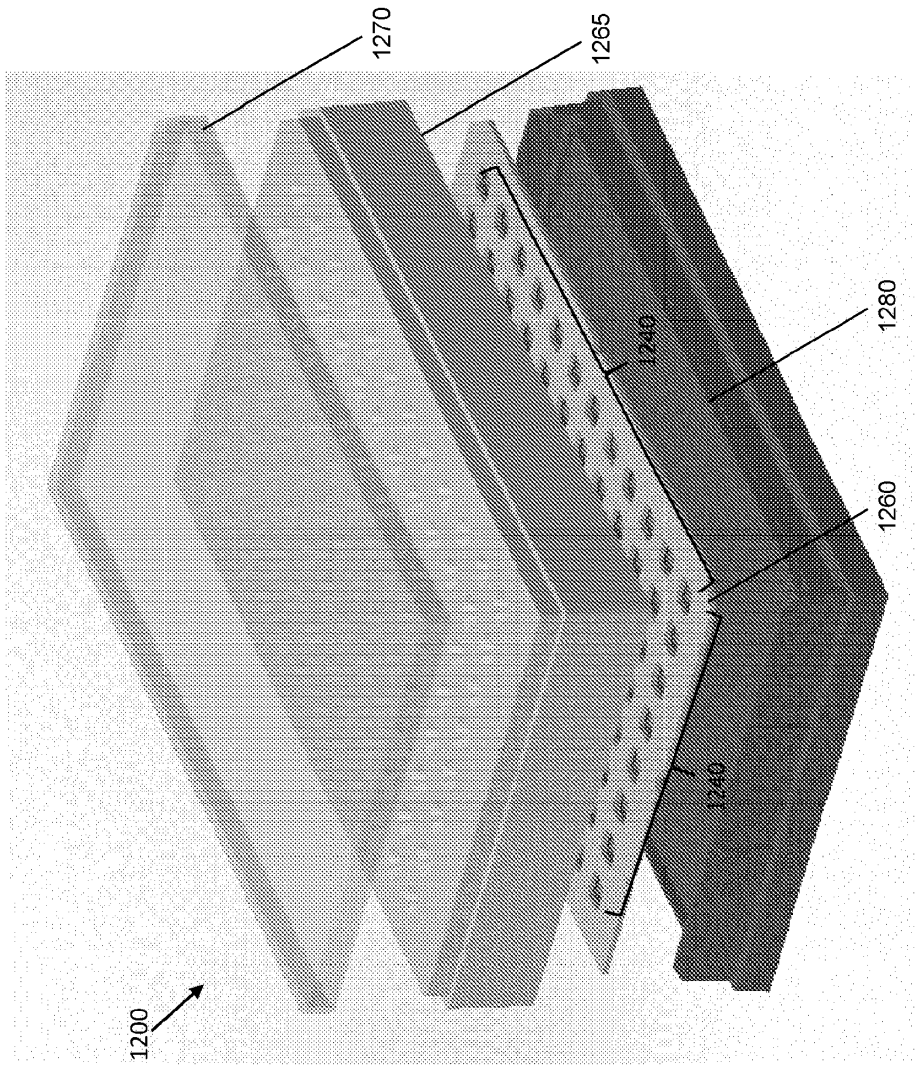


FIG. 12A

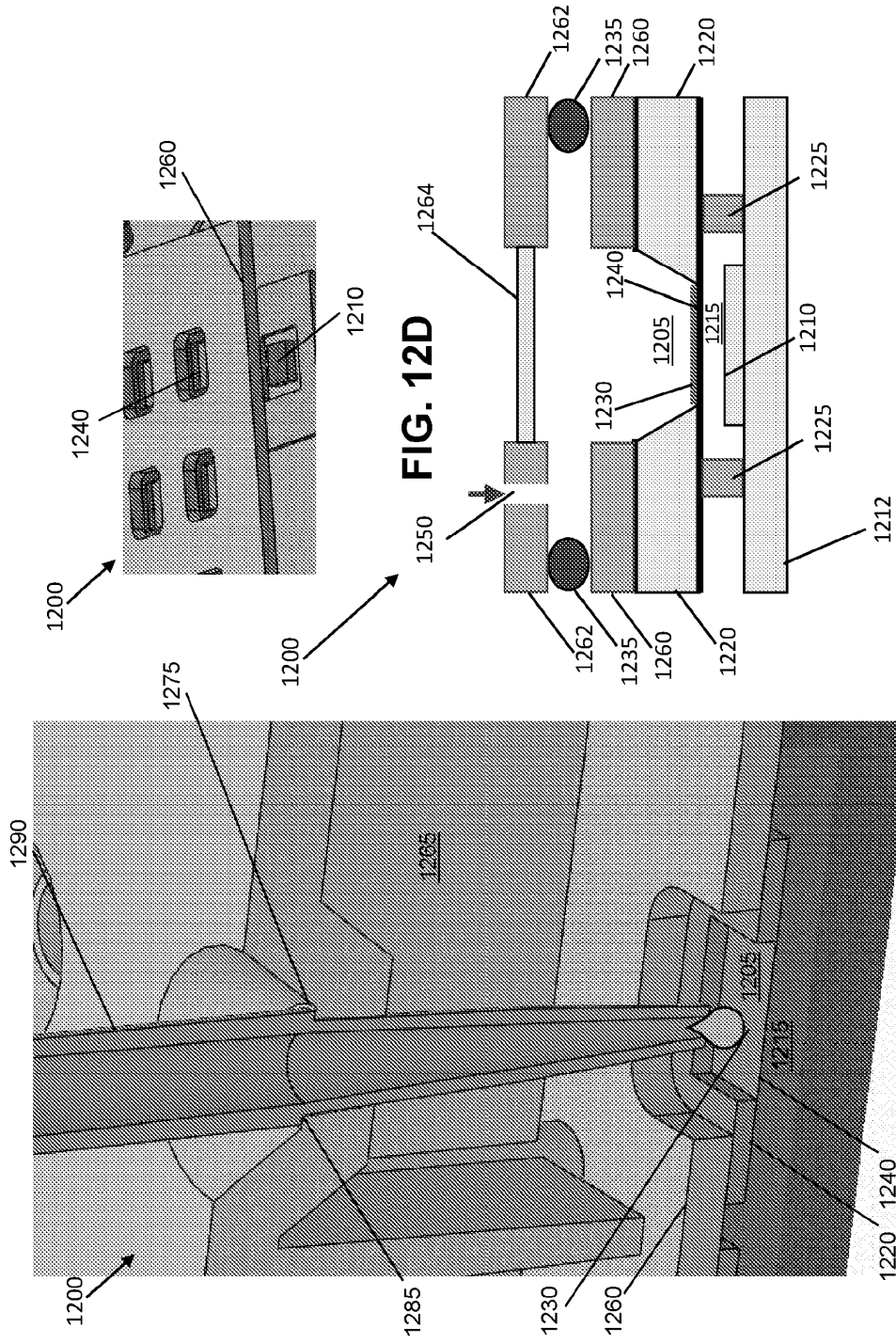


FIG. 12C

FIG. 12D

FIG. 12E

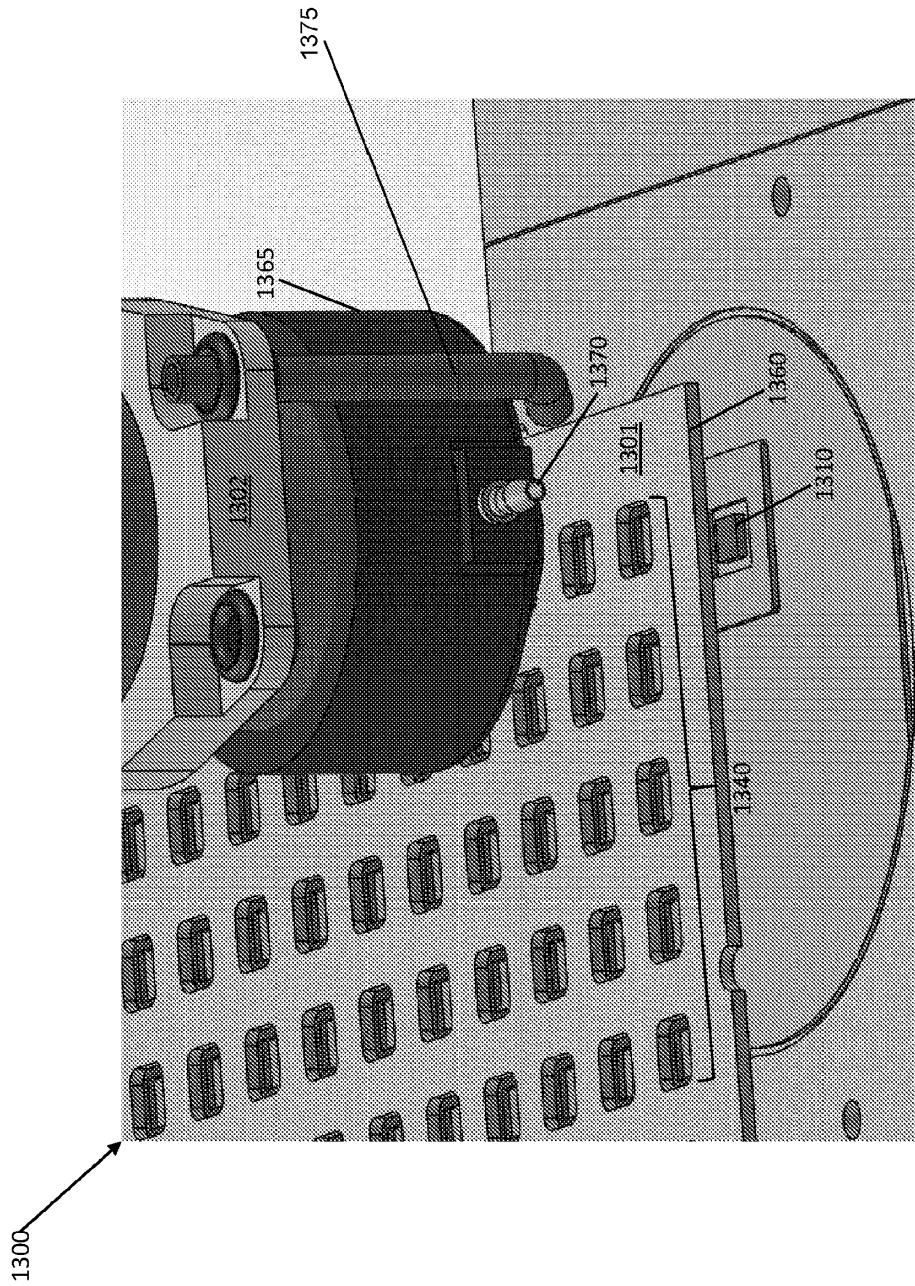


FIG. 13B

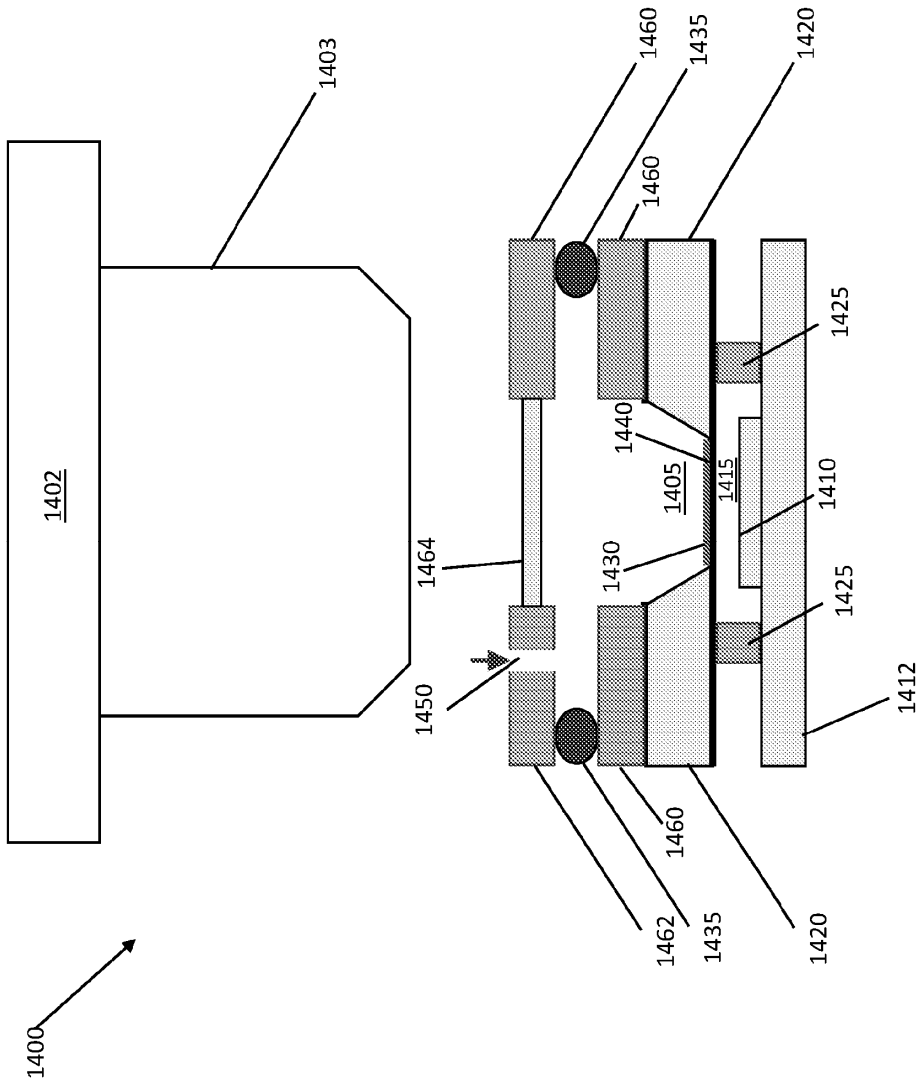


FIG. 14

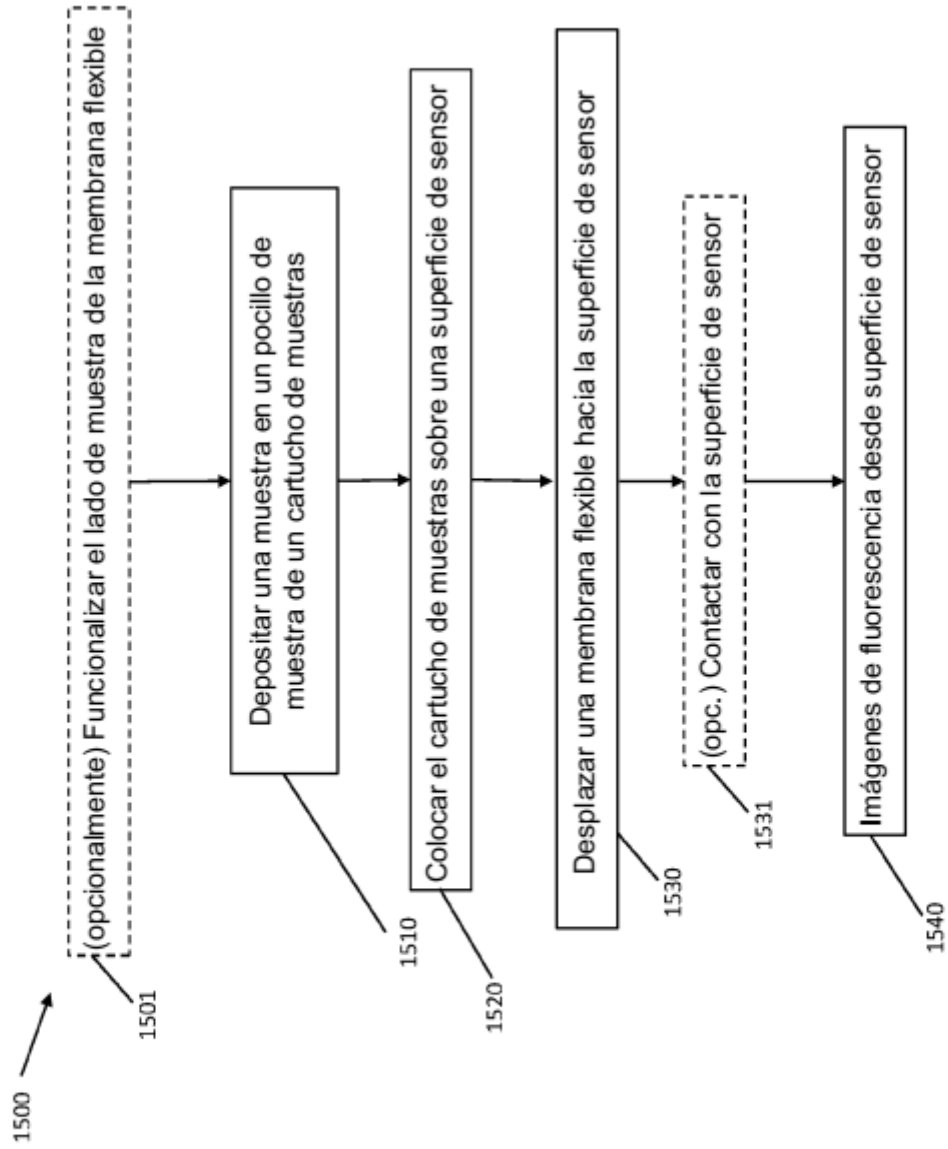


FIG. 15A

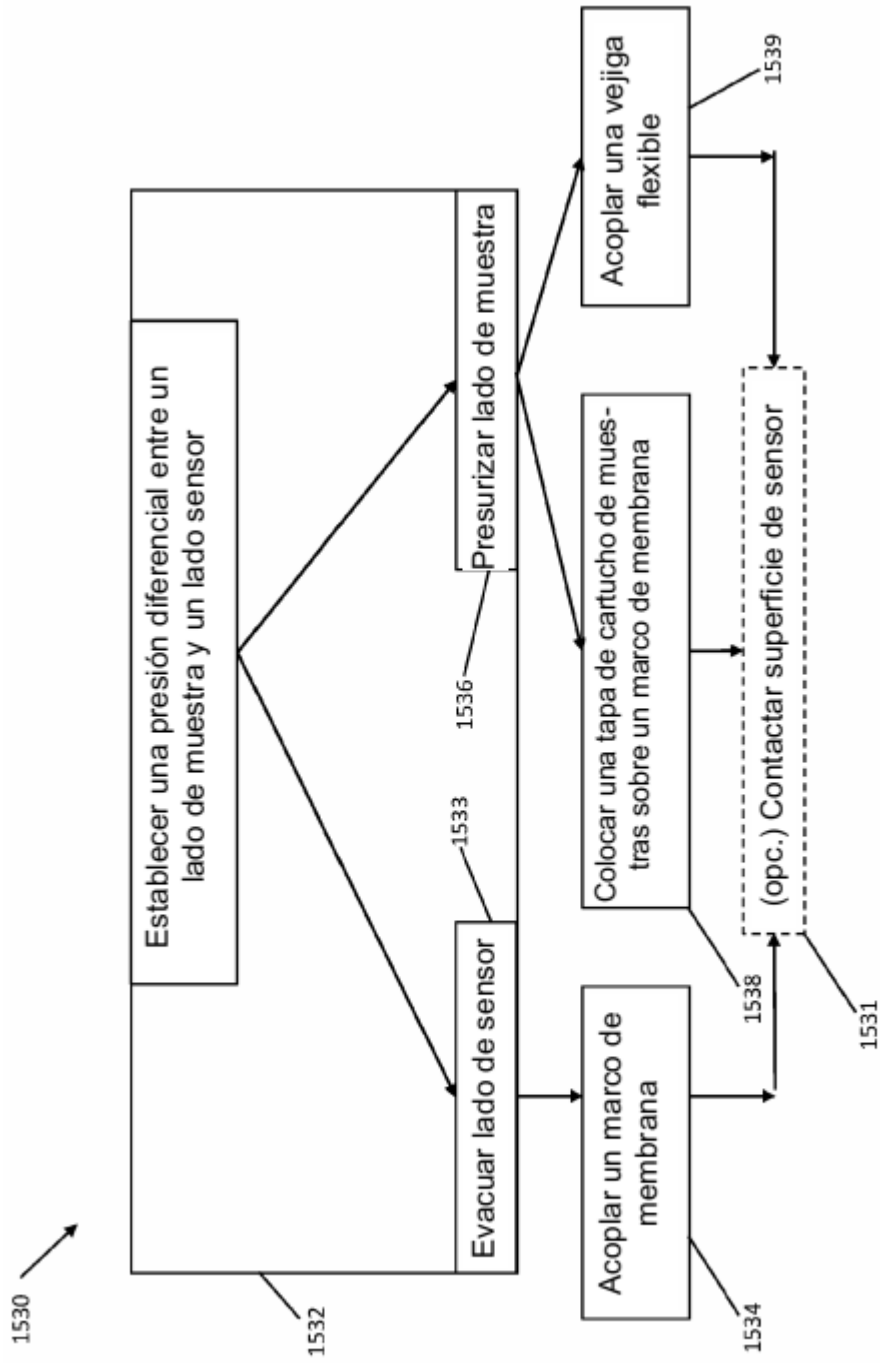


FIG. 15B

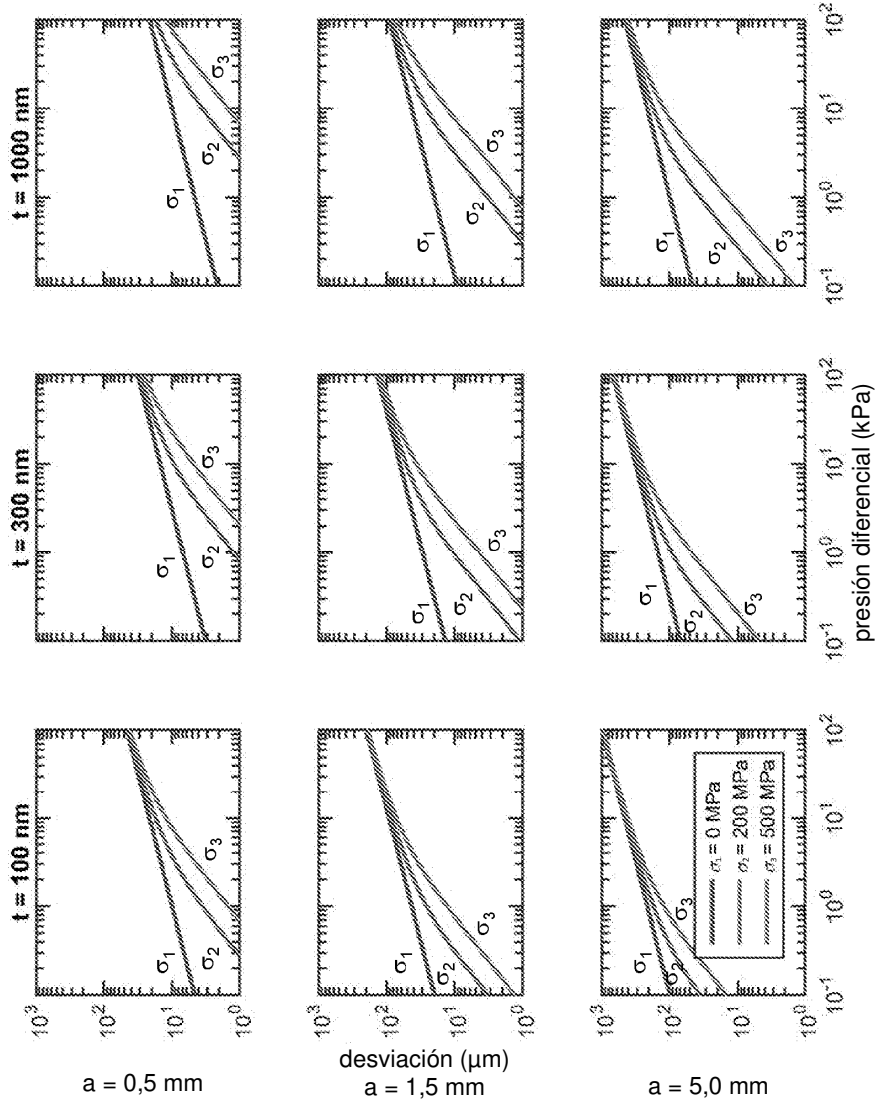
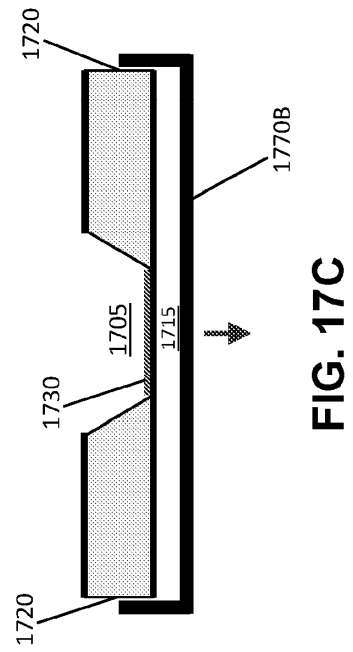
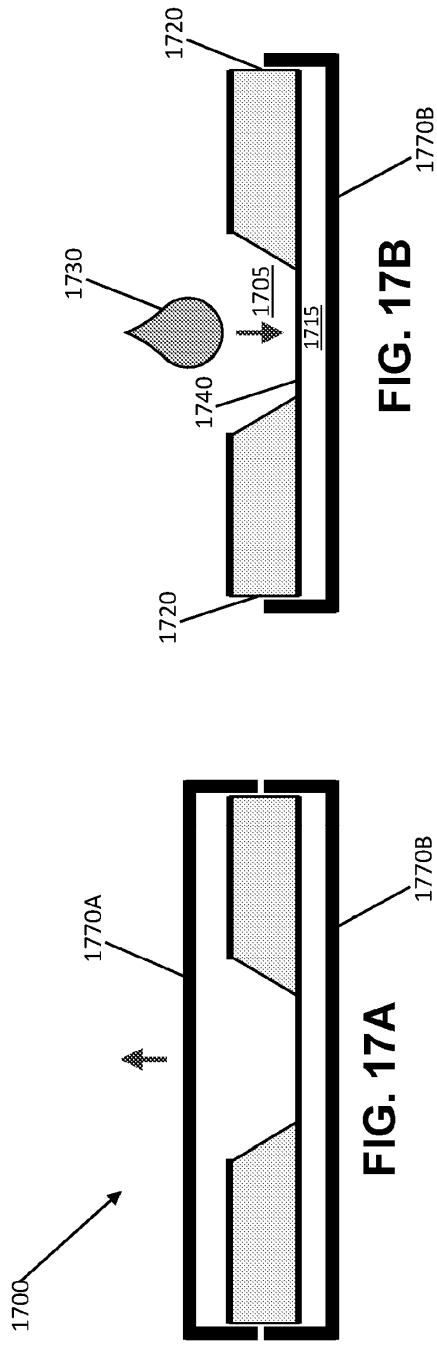


FIG. 16C

FIG. 16B

FIG. 16A



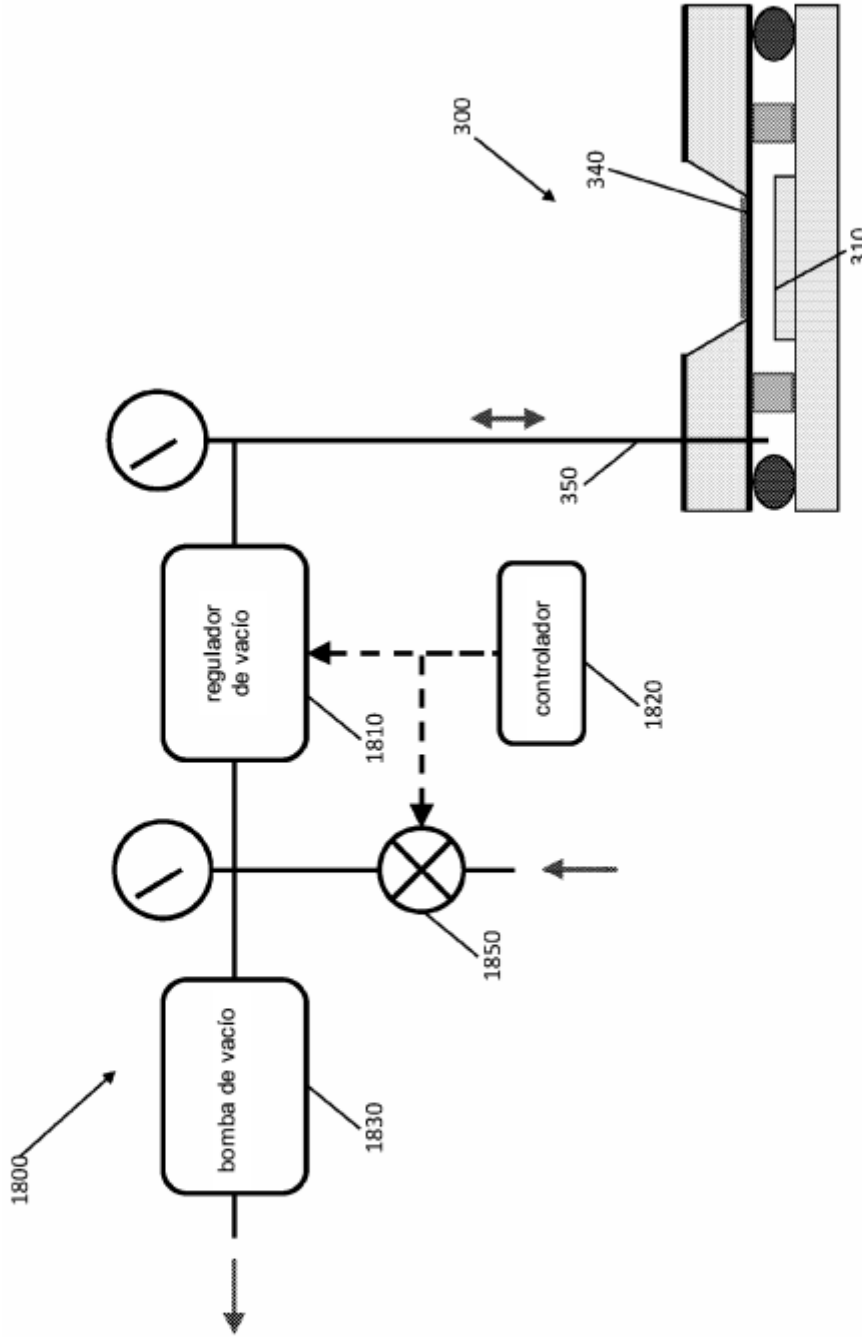


FIG. 18

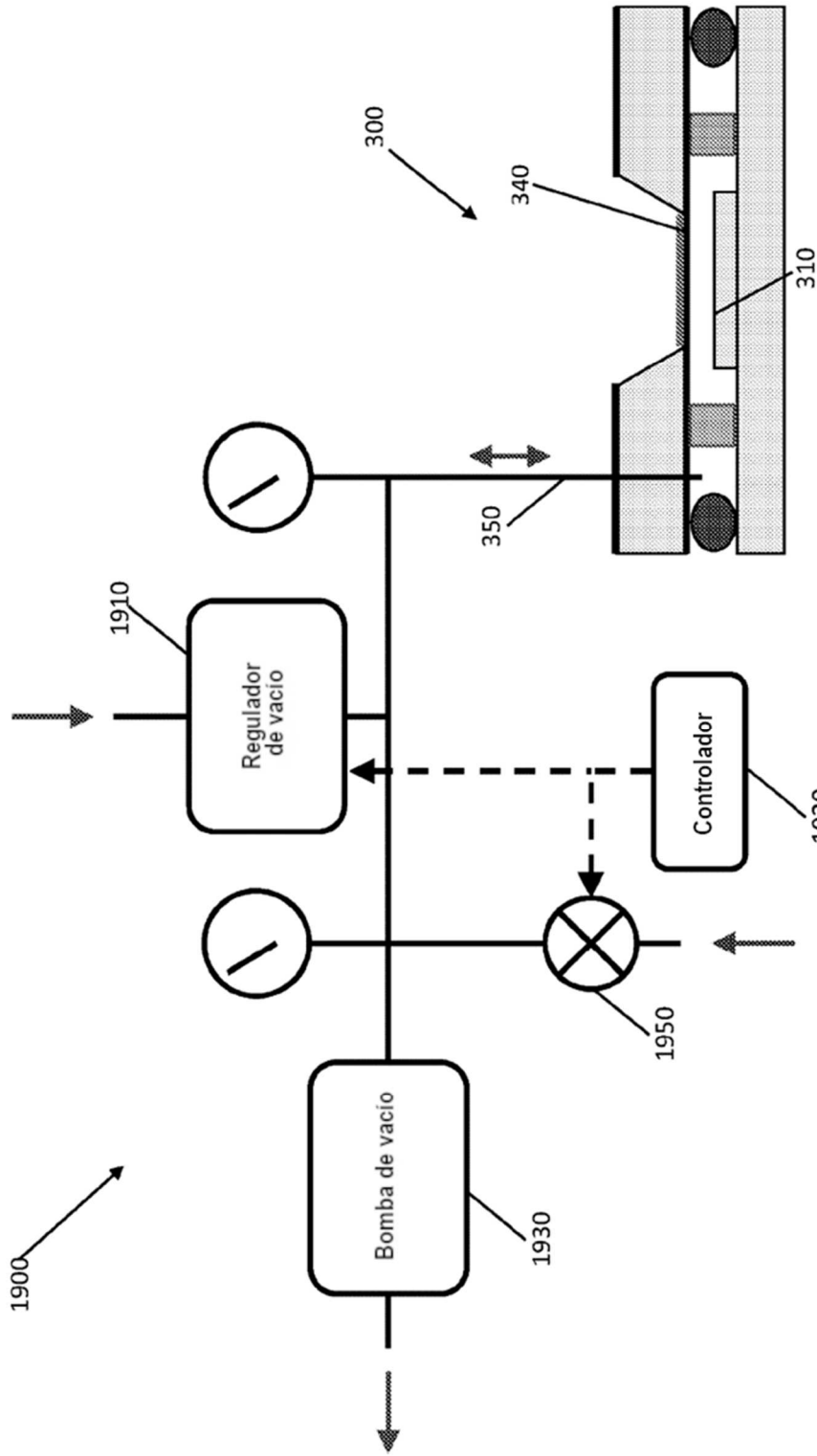


FIG. 19

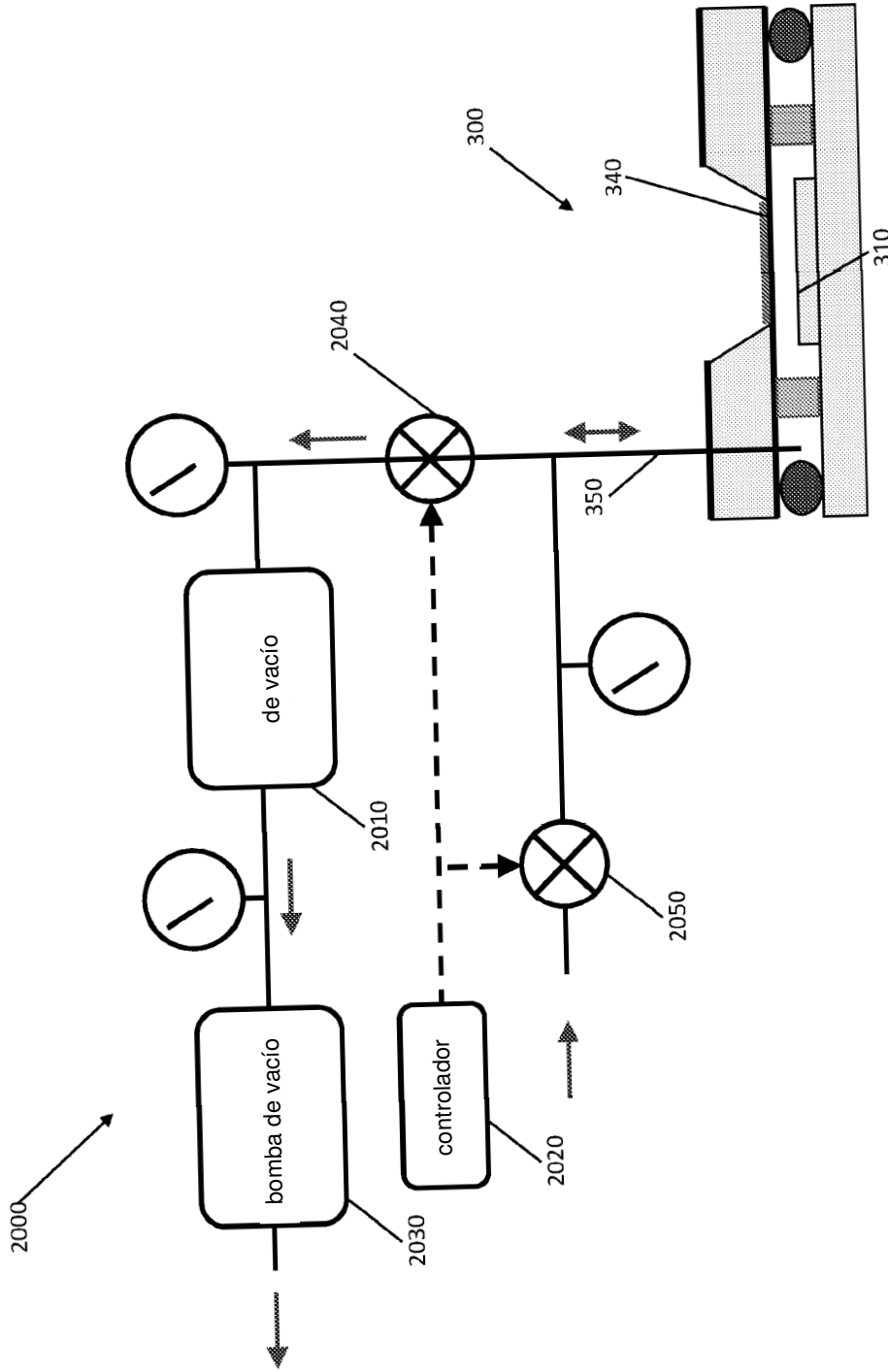


FIG. 20

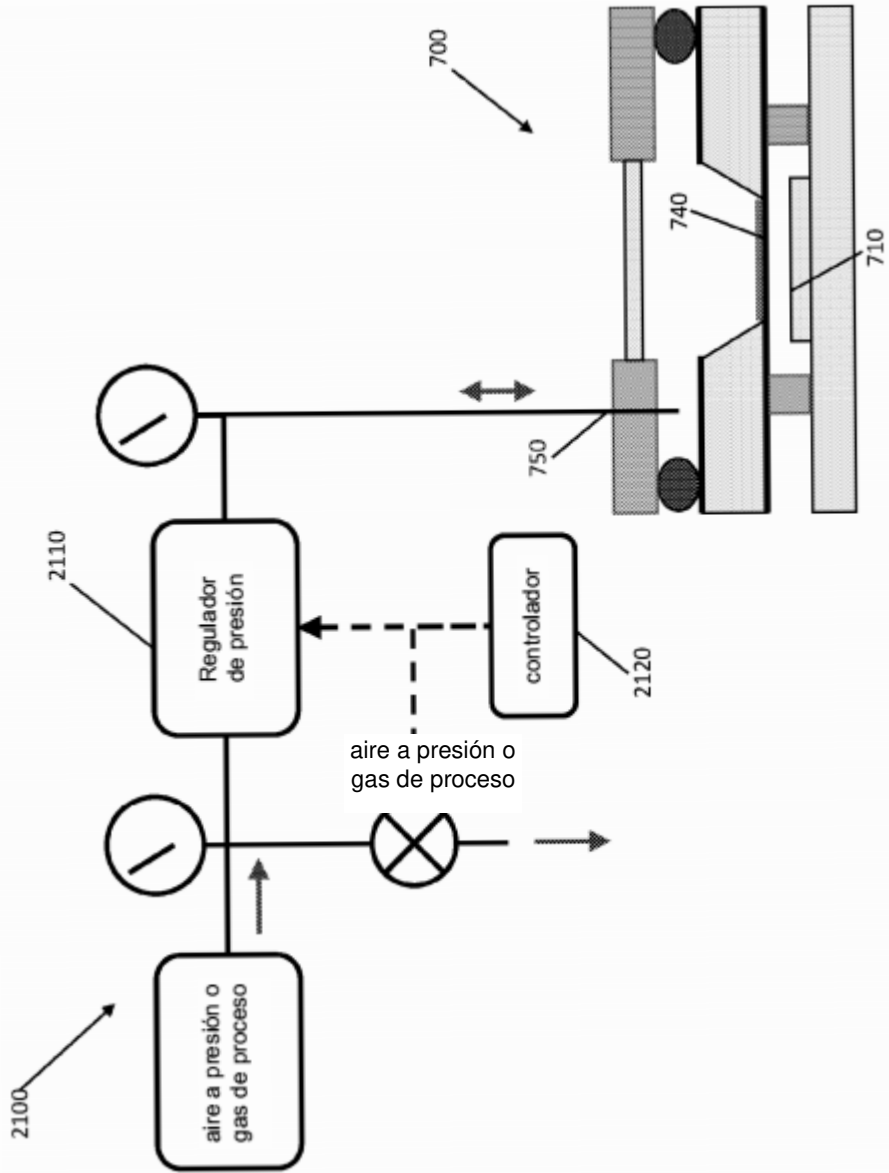


FIG. 21

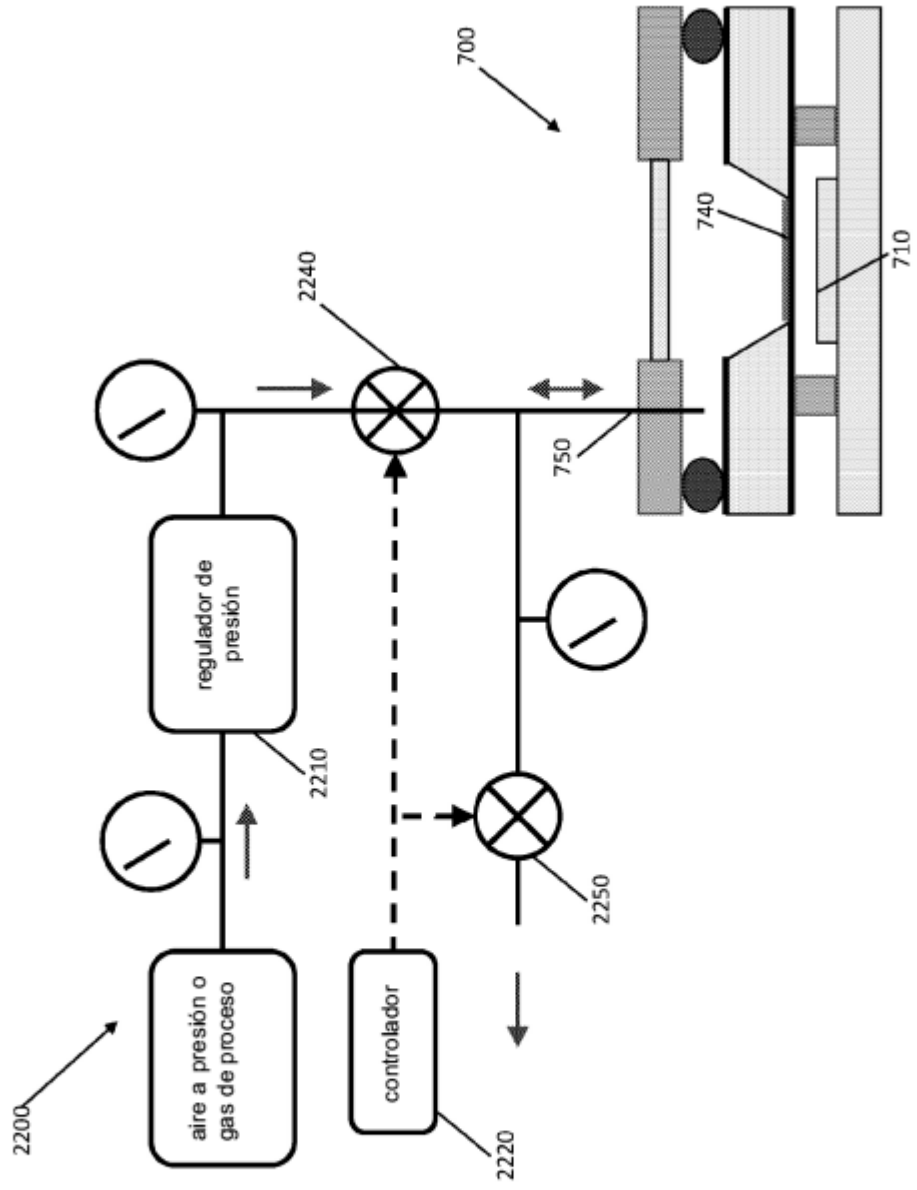


FIG. 22

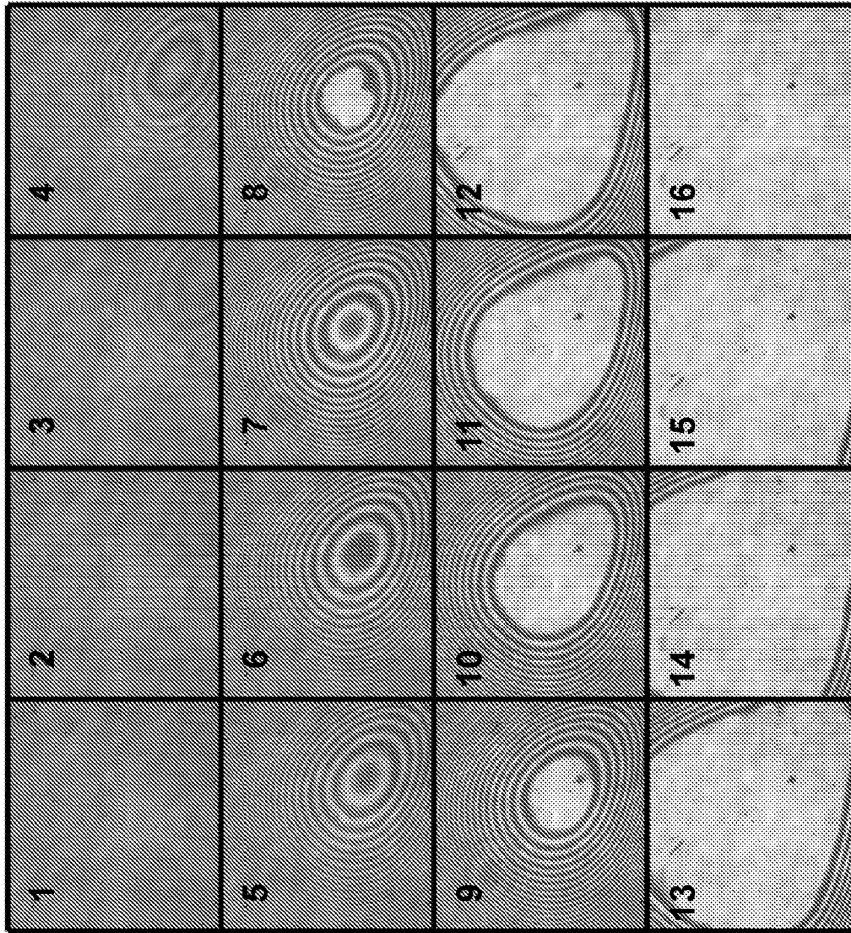


FIG. 23

