

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 792**

51 Int. Cl.:

**G01N 22/00** (2006.01)

**G01N 27/22** (2006.01)

**G01N 33/483** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2022 PCT/EP2022/053659**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2022 WO22179887**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2022 E 22705800 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024 EP 4298432**

54 Título: **Procedimiento y sistema de detección de señales de microondas que portan información de la dinámica funcional de partículas biológicas**

30 Prioridad:

**23.02.2021 EP 21382142**

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

**31.01.2025**

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
(100.00%)  
C/Jordi Girona 31  
08034 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**JOFRE CRUANYES, MARC;  
JOFRE CRUANYES, LLUÍS;  
JOFRE ROCA, LUIS;  
PALACIOS ARIAS, CÉSAR AUGUSTO;  
ROMEU ROBERT, JORDI y  
O'CALLAGHAN CASTELLÀ, JUAN MANUEL**

74 Agente/Representante:

**TORNER LASALLE, Elisabet**

ES 2 994 792 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

Procedimiento y sistema de detección de señales de microondas que portan información de la dinámica funcional de partículas biológicas

Campo técnico

- 5 La presente invención versa sobre mediciones de la dinámica funcional de partículas biológicas. En particular, la invención versa sobre la medición del potencial de la membrana de las partículas biológicas con una mezcla de frecuencias de microondas adaptada a la firma de señales característica de la membrana haciendo uso de la falta de linealidad de la respuesta tensión-corriente de la membrana de las partículas biológicas.

Antecedentes de la invención

- 10 En las neuronas (células eucariotas) se usa el potencial de acción para transmitir información a otras neuronas, mientras que en la acción equivalente de las biopelículas bacterianas los potenciales se generan para transmitir información a bacterias externas u otras del entorno. Los dos sistemas son conductualmente similares, pero es más fácil estudiar en profundidad la autoinducción en bacterias que la señalización entre células en eucariotas [1]. Avances recientes en microbiología han determinado que las bacterias son organismos modélicos fácilmente caracterizables con un conjunto de capacidades extraordinariamente complicado, comparable al de las células nerviosas o a la detección de todo el cerebro. Entre ellas está la autoinducción, un sistema de señalización entre células que puede tener un origen evolutivo común con la señalización entre células eucariotas, y relacionada con los potenciales de acción. Debido a esta facilidad comparativa de estudio, la dinámica bacteriana también es más apropiada para la interpretación directa que la dinámica eucariota, es decir, la de la neurona.

- 20 La expresión "potencial de acción" se refiere a la señalización eléctrica que se produce dentro de las neuronas o de biopelículas de bacterias, que surge por cambios en el potencial de las membranas a partir de concentraciones de iones en las inmediaciones de las membranas. Un potencial de acción es un aumento rápido y una caída subsiguiente en la tensión o potencial de las membranas a través de una membrana celular con un patrón característico. Se requiere una corriente suficiente para iniciar una respuesta de tensión en una membrana celular; si la corriente es insuficiente para despolarizar la membrana hasta el nivel umbral, no se activará un potencial de acción [2]. "Potencial de membrana" se refiere a la diferencia en carga entre el interior y el exterior de una célula (tal como neuronas o bacterias), que se crea debido a la distribución desigual de iones a ambos lados de la célula.

- 30 La membrana plasmática de una célula normalmente tiene un potencial transmembranal de aproximadamente  $-100$  mV (negativo en el interior) como consecuencia de los gradientes de concentración de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  que son mantenidos por los procesos de transporte activo. Normalmente, se detecta por medio de técnicas ópticas que usan marcadores biológicos [3], por ejemplo basados en optogenética incorporando en una célula eléctricamente excitable un indicador óptico [4]. Se obtiene una señal del indicador óptico en respuesta a una estimulación de la célula. En particular, sondas ópticas potenciométricas permiten mediciones del potencial de las membranas en orgánulos y en células bacterianas que son demasiado pequeñas para los microelectrodos. Las sondas potenciométricas son un procedimiento indirecto de detección de la translocación de estos iones, mientras que los indicadores iónicos fluorescentes pueden ser usados para medir directamente cambios en concentraciones de iones específicos. Además, junto con técnicas de formación de imágenes, estas sondas pueden emplearse para correlacionar variaciones en el potencial de las membranas a través de células excitables, con una resolución espacial y una frecuencia de muestreo que no pueden obtenerse usando microelectrodos. Además, la técnica de fijación de parches permite mediciones directas del potencial eléctrico, pero es muy invasiva. La técnica de fijación de parches se ha aplicado únicamente con membranas bacterianas aisladas o en esferoplastos y protoplastos gigantes. Por lo tanto, aunque la fijación de parches es una técnica potente para el estudio de canales iónicos en procariontas, no es adecuada para estudios de la dinámica del potencial de las membranas en condiciones fisiológicas.

- 45 En muchas situaciones, las ondas electromagnéticas interactúan con partículas no homogéneas y al correspondiente proceso de interacción entre el electromagnetismo y la materia se lo denomina dispersión. En la Figura 2 se representa un esquema general de la configuración de iluminación electromagnética y detección de la dispersión causada por una biopartícula pequeña (por ejemplo, una bacteria) en un medio (por ejemplo, agua). Aquí, "partícula" se refiere a una zona del espacio caracterizada por una permitividad dieléctrica compleja ( $\epsilon_s$ ,  $\sigma_s$ ) que es diferente de la del medio circundante ( $\epsilon_m$ ,  $\sigma_m$ ).

- 50 A frecuencias de microondas y para las dimensiones típicas de las configuraciones experimentales, las condiciones son de campo cercano. En particular, cuando la biopartícula está aislada debido al uso de disoluciones suficientemente diluidas, solo se considera la dispersión simple (no se considera la dispersión múltiple), como se describe en [5]. Sin embargo, en una situación general que también considerara biopartículas no diluidas (por ejemplo, dentro del cerebro) se aplicarían los mismos principios físicos y se consideraría la dispersión múltiple.

- 55 Dispersión causada por una pequeña partícula esférica

Cuando una onda electromagnética incide en un objeto, la onda incidente se modela como una onda electromagnética plana (suficientemente precisa, dado que el emisor es mucho mayor que la partícula). Supongamos que la onda

5 electromagnética esté polarizada en la dirección  $z$  y se propague en la dirección  $x$ . Supongamos también que la partícula es una pequeña partícula esférica con permitividad  $\epsilon_s$  y radio  $a$ . Esencialmente, la partícula ve un campo constante cuando la onda plana incide en ella (y en el campo casi electrostático en el campo incidente). El campo incidente polariza la partícula, haciéndola parecer un dipolo eléctrico. Dado que el campo incidente es un armónico de tiempo, el pequeño dipolo eléctrico oscilará e irradiará como un dipolo herciano en el campo lejano, pero también puede ser analizado en el campo cercano. Un dipolo herciano puede aproximarse con una pequeña fuente de corriente de modo que  $\vec{J}(\vec{r}) = \hat{z}I\delta(\vec{r})$ .

Régimen de campo cercano (podría llevarse a cabo un análisis similar para regímenes de campo lejano)

10 El campo eléctrico está dado por  $\vec{E} = -j\omega\vec{A} - \nabla\Phi$ , donde el término del potencial escalar domina sobre el potencial vectorial en el campo cercano del dispersor. El potencial escalar  $\Phi(\vec{r})$  se obtiene del calibre de Lorenz como  $\nabla\vec{A} = -j\omega\mu\epsilon\Phi$ , que da como resultado  $\Phi(\vec{r}) = \frac{-1}{j\omega\mu\epsilon} \nabla \cdot \vec{A} = \frac{-I}{j\omega\epsilon 4\pi} \frac{\partial}{\partial z} \frac{1}{r} e^{-j\beta r}$ . Cuando se está

cerca del dipolo, suponiendo que  $\beta r \ll 1$ , puede utilizarse una aproximación cuasiestática para el potencial (equivalente a ignorar el efecto de retardo)  $\frac{\partial}{\partial z} \frac{1}{r} e^{-j\beta r} \approx \frac{-\cos\theta}{r^2}$ , y reducir el potencial a  $\Phi(\vec{r}) \approx \frac{ql}{4\pi\epsilon r^2} \cos\theta$ . Este dipolo inducido en la pequeña partícula se forma en respuesta al campo incidente. El campo incidente puede aproximarse con un campo eléctrico estático local constante  $\vec{E}_{inc} = \hat{z}E_i$ . El correspondiente potencial electrostático para el campo

15 incidente es entonces  $\Phi_{inc} = -\hat{z}E_i$ , por lo que  $\vec{E}_{inc} \approx -\nabla\Phi_{inc} = \hat{z}E_i$ . El potencial dipolar disperso de la partícula esférica en las inmediaciones de la misma está dado por  $\Phi_{dis} = E_s \frac{a^3}{r^2} \cos\theta$ . El problema del límite electrostático es  $E_s = \frac{\epsilon_s - \epsilon}{\epsilon_s + 2\epsilon} E_i$ . En consecuencia, el campo eléctrico disperso está dado por

20  $\vec{E}_{dis} = \left[ \frac{k^2 a^3}{r} \frac{\epsilon_s - \epsilon}{\epsilon_s + 2\epsilon} - \frac{a^3}{r^3} \frac{\epsilon_s - \epsilon}{\epsilon_s + 2\epsilon} \right] E_i \hat{z} \approx -\frac{a^3}{r^3} \frac{\epsilon_s - \epsilon}{\epsilon_s + 2\epsilon} E_i \hat{z}$ . Puede obtenerse una derivación similar para el campo cercano magnético disperso dado por  $\vec{H}_{dis} \approx -\frac{ka^3}{r^2} \frac{\epsilon_s - \epsilon}{\epsilon_s + 2\epsilon} H_i \hat{z}$ , donde  $\vec{H}_{inc} = \hat{z}H_i$  es el campo magnético incidente.

Además, en términos de representación equivalente de circuito eléctrico de los campos dispersos, los campos magnéticos y el campo eléctrico perturbados dan lugar a un cambio en la capacitancia y la inductancia entre los electrodos. Este cambio puede derivar de la energía del sistema eléctrico perturbado causada por el momento dipolar

25 inducido  $\vec{p}$  como  $\Delta U = \frac{1}{2} \Delta C V_i^2 = -\frac{1}{2} \vec{p} \cdot \vec{E}_i$ , donde  $V_i$  es la tensión de excitación. Por ende, el cambio inducido

en la capacitancia puede expresarse como  $\Delta C = 4\pi a^3 \Re\{\epsilon K_{CM}\} \frac{|E_i|^2}{V_i^2}$ .

30 La permitividad compleja de las partículas biológicas no difiere mucho entre el estado de la membrana en reposo y aquel en el que están generando un potencial. La capacitancia de la membrana (relacionada con la parte real de la permitividad compleja) de las bacterias depende de su superficie, mientras que la conductividad de la membrana depende de su área en sección transversal. Por ende, no cabe esperar que resulte fácil observar una gran variación entre una partícula biológica en reposo y su generación de un potencial de acción haciendo uso de técnicas electromagnéticas lineales típicas, porque no cabe esperar que estas dimensiones físicas de las partículas biológicas tengan un cambio importante.

35 Con señales de RF se produciría una extracción de información directamente en la membrana de biopartículas si la conductividad eléctrica o la conductividad dieléctrica (en general, la permitividad compleja) de un componente biológico variara significativamente con la intensidad del campo eléctrico [6]. Los argumentos de simetría muestran que estos términos de orden superior deberían ser cero en elementos sólidos con simetría de inversión. En particular, en la polarización dieléctrica debida a dipolos giratorios, generalmente a frecuencias de microondas, cabría esperar

una falta de linealidad medible debida a la saturación de dipolos giratorios solo a temperaturas muy bajas y potencias de campo intensas; por ende, cabe esperar poca falta de linealidad. Sin embargo, el único ejemplo conocido de un componente biológico que es no lineal de manera detectable para campos de tejidos extracelulares promedio es una membrana celular. La bicapa lipídica neutra separa regiones de polaridad opuesta, por lo que la distribución de cargas es similar a la de una unión de semiconductores. Se demostró la falta de linealidad mediante la observación de que las membranas rectificaban señales de RF de señales de frecuencias por debajo de unos kHz. Sin embargo, el valor de la señal rectificada caía rápidamente a frecuencias más altas y a 100 kHz era cien veces menor que el valor a baja frecuencia, y sigue disminuyendo para frecuencias más altas.

La generación de armónicos de frecuencia a partir de una superficie de contacto también puede ser resultado de la acción de un campo eléctrico estático sobre la disolución madre debido a cargas superficiales. Este campo es responsable de una contribución  $\chi^{(3)}$  de susceptibilidad a la generación de segundos armónicos (SHG, por sus siglas en inglés) debido a la polarización de variedades disolventes por las cargas superficiales. Por lo tanto, la polarización total de segundo orden  $P_{2w}$ , que incluye las contribuciones  $\chi^{(2)}$  y  $\chi^{(3)}$  procedentes de una superficie de contacto entre sólidos y líquidos cargada está dada por  $P_{2w} = \chi^{(2)}E_wE_w + \chi^{(3)}E_wE_w\Phi$ . Fundamentalmente, el potencial interno de las membranas, producido por las biopartículas de interés, proporciona el campo (potencial)  $\Phi$  externo de frecuencia muy baja. Cuando se realizan mediciones del efecto no lineal superponiendo un campo alterno de baja intensidad sobre un campo estático de alta intensidad, la cantidad medida es la constante dieléctrica incremental dependiente del campo.

La teoría de los efectos dieléctricos no lineales está bien documentada, en particular en los campos estáticos [7]. El efecto de la saturación dieléctrica anómala se encuentra normalmente en compuestos alcohólicos terciarios, que tienen un valor relativamente bajo del factor de correlación de Kirkwood, y para disoluciones de otros alcoholes en disolventes no polares o polímeros polares, con base en la formación de pares polares en el líquido. Los pares moleculares tienen un momento dipolar neto, dependiendo del ángulo entre las moléculas que constituyen el par. El campo influye en el momento dipolar promedio del par molecular de tal manera que el momento dipolar promedio elevado del par molecular aumente a intensidades de campo mayores.

Se postulan efectos no térmicos de las microondas como consecuencia de una interacción directa propuesta del campo eléctrico con moléculas polares en el medio de reacción que no está relacionada con un efecto de temperatura en el medio. Normalmente, en la operación no térmica de las microondas, los efectos no lineales de las microondas serán  $\chi^{(2)} \approx 10^{-4}$  y  $\chi^{(3)} \approx 10^{-9}$ , mientras que el potencial de las membranas  $\Phi \approx 10^8$  V/m y la magnitud del campo incidente (régimen no térmico) será  $E_w = 1,5 \cdot 10^3$  V/m. La polarización estará dominada por el efecto del potencial de la membrana, como se muestra en la Figura 1.

En el caso de los polímeros polares, el origen de la respuesta no lineal es la saturación de la disposición de los dipolos y su signo es negativo. Además, en un potencial de campo eléctrico debido a la doble capa —como cuando una superficie de contacto cargada hace contacto con una disolución electrolítica— los iones en la disolución interactuarán con la superficie de contacto cargada y se distribuirán en consecuencia por sí mismos. La presencia de contraiones apantalla el campo eléctrico estático debido a la superficie de contacto cargada y disminuye la magnitud del campo a medida que aumenta la distancia desde la superficie de contacto. Comúnmente se aplica tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) como electrolito para la aplicación de biosensores, dado que la concentración iónica y la osmolalidad del PBS son similares a las del cuerpo humano.

Se ha propuesto un experimento que comprueba si las estructuras eléctricas y magnéticas de las células biológicas presentan las respuestas no lineales necesarias para la desmodulación. Pueden usarse una cavidad Q con un valor elevado y una amplificación de ruido muy baja para detectar respuestas no lineales sumamente débiles que aparecen como segundo armónico de un campo de RF incidente sobre la muestra. Los campos no lineales distribuidos a partir de células biológicas metabólicamente activas cultivadas en monocapa o suspendidas en un medio pueden ser distinguidos de las faltas de linealidad del aparato.

Las estimaciones de la sensibilidad teórica de las señales y del análisis del ruido del sistema indican la posibilidad de detección de una señal de microondas a 1,8 GHz (2º armónico de 900 MHz), tan débil como un fotón de microondas por célula por segundo. El límite práctico, establecido por la degradación de la cavidad Q, es sumamente bajo en comparación con el segundo plano térmico, mucho más brillante, que tiene su pico en el infrarrojo, a una longitud de onda de aproximadamente 17  $\mu\text{m}$  e irradia 10 fotones infrarrojos por segundo por célula en la estrecha banda de frecuencias dentro del 0,5% del pico. El sistema puede ser calibrado mediante la introducción de cantidades conocidas de material no lineal; por ejemplo, un diodo Schottky. Operando en la dirección de conversión de frecuencia inversa con fines de calibración, para una potencia de entrada de 160  $\mu\text{W}$  a 900 MHz incidente sobre tal material biológico, se calcula que el aparato produce una robusta señal de salida de 0,10 mV a 1,8 GHz si se la detecta con un analizador de espectro y un amplificador de bajo ruido de 30 dB de ganancia.

Se ha divulgado que la presencia de productos armónicos debido a la posible interacción no lineal de señales de RF moduladas en amplitud en células vivas se detecta de manera óptima usando una cavidad con un factor de calidad elevado. Los productos armónicos generados por osciladores elementales pueden quedar atrapados y acumularse en una cavidad, permitiendo una sensibilidad de detección mucho mayor que en un entorno abierto, donde se irradiarían

en todas las direcciones. El procedimiento experimental descrito en [9] es un planteamiento sistemático para la detección de la energía de RF no de Planck (en caso de haberla) emitida por una muestra expuesta de células vivas.

También ha habido un estudio que versa sobre señales de RF moduladas en amplitud y centrado en una configuración específica de laboratorio establecida para la detección de señales de RF con sensibilidad potencialmente elevada. Por ende, los autores discuten y entran en explicaciones sobre un sistema de detección de potenciales que añade a la frecuencia principal portadora de señales (microondas) una señal de banda lateral de baja frecuencia (por debajo de la RF) en función de un proceso de conversión de frecuencia a la baja.

Descripción de la invención

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una configuración detectora de microondas para la medición del potencial de las membranas que supere las limitaciones de la técnica anterior. Con este fin, la invención comprende las etapas de excitación de potenciales oscilantes de microondas para producir una mezcla del campo electromagnético iluminador por microondas a frecuencias dadas dentro de la membrana de las partículas biológicas, que generará un campo disperso a la frecuencia fundamental y también a los armónicos relacionados con la relación no lineal entre la tensión y la corriente en la membrana de las partículas biológicas.

En particular, el proceso paramétrico de las frecuencias usa una generación de frecuencia suma a partir de dos haces de entrada, siendo este un proceso de conversión de energía al alza. Normalmente, los procesos de conversión de la frecuencia a la baja, generalmente usados en la bibliografía, tienen eficacias entre 2 y 4 órdenes de magnitud por debajo de los procesos de conversión de la frecuencia al alza.

El objeto anteriormente citado se cumple mediante un procedimiento con las características de la reivindicación 1 y con un sistema con las características de la reivindicación 8.

Las realizaciones de la presente invención proporcionan, según un primer aspecto, un procedimiento de detección de señales de microondas que portan información de la dinámica funcional de partículas biológicas. El procedimiento comprende iluminar una o más partículas biológicas con ondas electromagnéticas de microondas, estando comprendidas las ondas electromagnéticas de microondas en un régimen de intensidad no térmica, que tienen frecuencias con longitudes de onda mucho mayores que las dimensiones características de la o las partículas biológicas y están adaptadas a una firma de la dinámica funcional de la o las partículas biológicas; adaptar/transformar las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación para producir frecuencias adicionales (es decir, armónicos) mediante un proceso paramétrico de conversión al alza de mezcla de frecuencias en una zona de las inmediaciones de la membrana de la o las partículas biológicas con una relación no lineal; captar una respuesta afectada por la relación no lineal en diferentes estados funcionales de la o las partículas biológicas; y detectar, por medio de un elemento filtrante, las componentes frecuenciales resultantes de la respuesta captada, para inferir a partir de ello la dinámica funcional de la o las partículas biológicas.

En particular, la relación no lineal es una relación no lineal de corriente-tensión que produce un potencial de tensión en la superficie de contacto de la membrana. La relación no lineal del medio sigue un efecto de la saturación dieléctrica anómala que se encuentra normalmente en compuestos alcohólicos terciarios, que tienen un valor relativamente bajo del factor de correlación de Kirkwood, y para disoluciones de otros alcoholes en disolventes no polares o polímeros polares, con base en la formación de pares polares en el líquido. Por tanto, en algunas realizaciones, las ondas electromagnéticas de microondas son reguladas/adaptadas al medio que comprende la o las partículas biológicas, siendo dicho medio un alcohol, un tampón biológico iónico, un polímero, etc.

En una realización, las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación se emplean a una potencia muy por debajo de un umbral que pueda provocar daños térmicos en la o las partículas biológicas. De manera alternativa o complementaria, las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación se emplean de modo que la duración de la iluminación esté adaptada a la dinámica funcional temporal de la o las partículas biológicas. También de manera alternativa o complementaria, las frecuencias de las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación pueden ser reguladas a las resonancias de la dinámica de la o las partículas biológicas.

En una realización, el procedimiento comprende, además, una etapa de aislamiento de las frecuencias de las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación, ya sea espacialmente o en frecuencia.

Algunas realizaciones de la presente invención también proporcionan, según un segundo aspecto, un sistema de detección de señales de microondas que portan información de la dinámica funcional de partículas biológicas. El sistema comprende una partícula biológica, un generador de microondas, un adaptador/controlador de iluminación, un detector de microondas y un elemento filtrante.

El generador de microondas está adaptado/configurado para producir ondas electromagnéticas de microondas para iluminar la partícula biológica, estando comprendidas las ondas electromagnéticas de microondas en un régimen de intensidad no térmica, que tienen frecuencias con longitudes de onda mucho mayores que las dimensiones características de la partícula biológica y están adaptadas a una firma de la dinámica funcional de la partícula biológica. El adaptador de iluminación está adaptado/configurado para adaptar las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación para producir frecuencias adicionales a través de un proceso paramétrico de conversión al alza de mezcla

de frecuencias en una zona de las inmediaciones de la membrana de la partícula biológica con una relación no lineal. El detector de microondas adaptado/configurado para captar una respuesta afectada por la relación no lineal en diferentes estados funcionales de la partícula biológica. El elemento filtrante está adaptado/configurado para detectar las componentes frecuenciales resultantes de la respuesta captada.

5 En una realización, el sistema también incluye un elemento de aislamiento espacial o frecuencial para aislar las frecuencias de las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación.

En una realización, el generador de microondas está adaptado para emitir impulsos y funcionar de modo que la duración de la iluminación se regule a la dinámica funcional temporal de la partícula biológica.

10 El adaptador de iluminación y el detector de microondas pueden estar situados de forma ya sea mutuamente colineal o adyacente. En otras realizaciones, el adaptador de iluminación puede estar dispuesto a uno de los lados de la partícula biológica, mientras que el detector de microondas está dispuesto a otro lado de la partícula biológica. En cualquier caso, no es preciso que ambos elementos/unidades estén directamente enfrentados.

15 En una realización, el elemento filtrante es un filtro de frecuencias de paso alto. En otra realización, el elemento filtrante comprende un receptor de filtro adaptado configurado para aprovechar esquemas de procesamiento de señales por filtro adaptado, por ejemplo productos de intermodulación pasiva (PIMP, por sus siglas en inglés), entre otros.

En una realización, el detector de microondas está basado en esquemas de detección electromagnética cuántica sensible.

20 La presente invención permite medir diferencias minúsculas de señales que han limitado el estado de la técnica actual. En particular, el procedimiento propuesto usa un sistema que tiene dos (o más) frecuencias de iluminación, a frecuencias de microondas. Por una parte, estas frecuencias, como mínimo, tienen que ser separadas más que las bandas laterales del ruido de fase de las frecuencias de microondas de iluminación, a la vez que cumplir los requisitos explicados a continuación. Por otra parte, los términos ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) de interferencia de intermodulación no lineal en los sistemas de detección típicos se comportan como  $aA + bA^2 + cA^3$  con la amplitud  $A$ , siendo normalmente la potencia  $P = A^2/Z$ , siendo  $Z = 50$  el valor típico de impedancia. Considerando que la amplitud  $A$  consiste en dos (o más) señales sinusoidales de amplitud con frecuencias ( $f_1$  y  $f_2$ ), amplitudes ( $A_1$  y  $A_2$ ) y una diferencia de fase  $\phi$ , la amplitud  $A$  es igual a  $A_1 \cos(2\pi f_1 t) + A_2 \cos(2\pi f_2 t + \phi)$ . Considerando la relación particular entre las frecuencias de iluminación  $f_2 = 2f_1$  y trabajando las señales a través del sistema a la frecuencia  $f_1 + f_2$ , la amplitud corresponde a  $0,75cA_1^3 + bA_1A_2 \cos \phi$ . Obsérvese que otras relaciones entre las frecuencias de iluminación elegidas y el punto de frecuencia de observación final también permiten llevar a cabo el procedimiento propuesto para reducir la interferencia de intermodulación no lineal. Por ende, escogiendo debidamente las frecuencias de iluminación, la potencia de iluminación en cada frecuencia y la fase entre ellas, se puede adaptar una autocancelación de interferencias (técnica PIMP) para mejorar el nivel de la señal con respecto a los términos de ruido de intermodulación (como una mejora de la relación señal-ruido), como se muestra en las Figuras 6A y 6B.

Breve descripción de los dibujos

35 Las ventajas y características anteriores y otras se entenderán más plenamente a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones, con referencia a las figuras adjuntas, que deben ser consideradas de manera ilustrativa y no limitante, en las cuales:

40 La Figura 1 ilustra el cambio en la modulación por posición de impulsos (ppm, por sus siglas en inglés) en la potencia del segundo armónico debido a un potencial de acción y un potencial en reposo. La intensidad del campo estático en un potencial de acción alcanza su máximo a 100 MV/m, produciendo un cambio en la potencia del segundo armónico de 800 ppm, mientras que en el potencial en reposo no se produce ningún cambio en el segundo armónico.

45 La Figura 2 es un esquema general de la configuración de iluminación electromagnética y detección de la dispersión causada por una biopartícula pequeña (por ejemplo, una bacteria) en un medio (por ejemplo, agua). la respuesta electromagnética de las bacterias depende de su forma y su tamaño, de su estructura interna y de la conductividad y la permitividad eléctricas de los diferentes componentes de la célula bacteriana, que pueden depender del estado fisiológico bacteriano pero dependen muy poco del estado funcional de las bacterias. Se presentan el esquema de la configuración y los valores relevantes representados, donde  $\epsilon_s$  representa la permitividad de la célula,  $\sigma_s$  la conductividad,  $a$  el radio,  $\epsilon_m$  la permitividad del medio,  $\sigma_m$  la conductividad,  $d_p$  es la longitud de las placas de iluminación y detección, y  $ds$  es la distancia a la célula (considerada equidistante).

La Figura 3 muestra diferentes configuraciones para poner en práctica el proceso según la invención, en las cuales el elemento de detección está situado con orientaciones diferentes con respecto al elemento de iluminación.

55 La Figura 4 ilustra la respuesta no lineal tensión-corriente del potencial de la membrana; (arriba) dependencia no lineal de la densidad de corriente con el potencial de tensión diferencial; (recuadro) densidad de corriente inducida debida a un campo de microondas incidente a dos estados diferentes de potencial de las membranas, mientras está en reposo y mientras genera un potencial de acción. Las magnitudes de la densidad de corriente inducida difieren en ocho

órdenes de magnitud; (abajo) se muestra un esquema de membrana en el que se da una respuesta rápida por medio de un cambio en su estructura electrónica, en respuesta a un cambio en el campo eléctrico circundante.

5 La Figura 5 ilustra el análisis del dominio frecuencial en el que la frecuencia (de bombeo) fundamental está dispersa debido a la biopartícula y su estado funcional está enmascarado por la propia iluminación, haciendo muy difícil detectar la diferencia entre las bacterias en reposo y en un estado de potencial de acción. En vez de ello, la diferencia de la respuesta electromagnética de las bacterias en los dos estados funcionales diferentes en el segundo armónico frecuencial es de aproximadamente 8 órdenes de magnitud.

10 Las Figuras 6A y 6B muestran el procedimiento de autocancelación de productos de intermodulación pasiva. Considérense los términos  $a$ ,  $b$  y  $c$  de intermodulación no lineal de un sistema, siendo  $a = 1$ ,  $b = 10^{-3}$  y  $c = 10^{-4}$ , y una potencia incidente de -10 dBm para una de las frecuencias. La Figura 6A representa gráficamente la mejora en la relación particular señal-ruido (S/R) para la relación y la fase de potencia específicas para la segunda frecuencia de iluminación. La relación S/R entre la señal y la interferencia (debida al equipo de medición) se amplía dentro de las relaciones específicas de potencia y la fase de la segunda frecuencia de iluminación con respecto a la primera frecuencia. En particular, pueden lograrse mejoras en la relación S/R de más de 40 dB, como se muestra en la Figura 6B.

20 La Figura 7 muestra que los niveles de señal relativos a los campos magnéticos son ligeramente mayores que los de los campos eléctricos para las frecuencias más elevadas. Considerando el campo magnético o eléctrico, el nivel de la señal de segundo orden es cercano al nivel de ruido. Pueden aplicarse diferentes técnicas para mejorar la sensibilidad de los detectores, tales como los novedosos esquemas de detección electromagnética cuántica.

25 Las Figuras 8A y 8B muestran un ejemplo en el cual la iluminación con señales de microondas está adaptada a la firma de la dinámica funcional de la partícula biológica, para distinguir estas del potencial que otras señales presentan en el sistema y que no portan información de la dinámica funcional de las partículas biológicas.

#### Descripción detallada de realizaciones preferidas

30 La presente invención se basa en la transformación de la energía iluminante en las frecuencias de microondas iluminantes para producir armónicos subsiguientes dentro de la dependencia no lineal de corriente-tensión en las membranas de las partículas biológicas.

35 Más en particular, la presente invención proporciona un procedimiento y un sistema de medición del potencial de las membranas que porta información sobre la dinámica funcional de las partículas biológicas por medio de una dispersión no lineal de microondas. La invención emplea señales de microondas por medio de la firma de señales de la dinámica de las partículas biológicas, combinada con la respuesta no lineal de la membrana de los microorganismos, transforma las frecuencias del campo electromagnético de microondas iluminante incidente en una secuencia de armónicos, y detecta la señal resultante. La señal detectada es representativa de la dinámica funcional de las partículas biológicas.

40 Según una primera realización, mostrada en la Figura 2, esto se logra iluminando la partícula biológica con ondas electromagnéticas de microondas a frecuencias  $f_1, f_2, \dots$  (por ejemplo, 1 - 100 GHz), en donde las diferentes frecuencias de iluminación pueden estar indicadas como  $f_i$  en donde las intensidades específicas de las señales de microondas iluminantes en el régimen no térmico (por ejemplo, 0 - 30 dBm) y las frecuencias (por ejemplo, con frecuencias incidentes mucho mayores que la dimensión característica equivalente de la partícula biológica de  $1 \mu\text{m} - 1 \text{mm}$ , estando  $\Delta f$  en el intervalo de 100 Hz - 10 GHz) se regulan debidamente para producir la mezcla de las frecuencias, relacionadas por el principio de conservación de la energía  $\sum f = \sum_{n=1}^N f^N$ , dentro de la membrana de la célula biológica, produciendo, con una eficacia de transformación relativamente alta, varios armónicos  $f^1, f^2, \dots, f^N$ . Además, los términos no lineales de orden superior se vuelven significativos a medida que aumenta la tensión a través de la membrana de la partícula biológica, tal como en el proceso de generación de un potencial de acción.

45 Las membranas celulares, así como las intracelulares, presentan un claro comportamiento eléctrico no lineal, debido a la barrera de potencial resultante de la diferencia entre los electrolitos internos y externos y la acción de bombas iónicas. En ausencia de un potencial de acción, la diferencia de potencial transmembranal  $\Delta\phi$  es igual al potencial en reposo de la célula,  $V_0$  ( $\approx -100 \text{ mV}$ , en una célula típica). Cuando se produce un potencial de acción, aparece un exceso de potencial transmembranal  $\Delta\phi = V_0 + \delta\phi$ . En consecuencia, fluye una densidad de corriente transmembranal  $\vec{J}_m$ . Es sabido que la respuesta corriente-tensión puede aproximarse bastante bien con una relación no lineal de tipo

50 diódico de la forma  $J_m = J_0 \left( e^{\delta\phi/V_T} - 1 \right)$  con valores típicos  $J_0 \approx 10^{-5} \text{ A/cm}^2$ ,  $V_T \approx 5 \text{ mV}$ . En consecuencia, todas las variables eléctricas de interés (por ejemplo, campos, corrientes, etc.) pueden derivarse del potencial escalar único  $\Phi(\vec{r})$  que se produce.

Con referencia de nuevo a la Figura 2, la membrana de la célula es iluminada con campos de microondas, mientras que el punto operativo de polarización en el modelo no lineal de tensión-corriente estará determinado por el estado de potencial propio de la partícula biológica. Dependiendo del estado del potencial de la membrana, se dispersarán las señales de microondas incidentes reguladas, que tienen múltiples armónicos frecuenciales generados (debido al modelo no lineal de tensión-corriente de la membrana), en comparación con las señales iluminantes incidentes. En particular, usando la expansión en serie de Taylor para los primeros dos términos de la densidad de corriente transmembranal  $J_m$ , la eficiencia esperada del proceso de segundo orden a  $\delta_\phi = 100$  mV, en comparación con  $\delta_\phi = 0$  mV, es  $2 \cdot 10^8$  veces mayor, mientras que el proceso de segundo orden a  $\delta_\phi = 100$  mV en comparación con el primer orden es  $3 \cdot 10^{-5}$ , lo cual sigue siendo considerablemente eficiente.

Cuando hay una incidencia de campos con frecuencias de microondas (por ejemplo, 10 GHz), se genera una densidad de corrientes inducidas en el punto operativo del estado de potencial de la membrana, en donde aumentan su magnitud y sus armónicos frecuenciales cuando la célula se encuentra a un potencial de acción en comparación con un estado en reposo. La dispersión de las frecuencias (de bombeo) de iluminación debida a la membrana (en torno a 10 nm) queda oscurecida en comparación con la dispersión generada por todo el cuerpo de la célula (que es al menos dos órdenes de magnitud mayor), haciendo muy difícil detectar la diferencia entre las bacterias en reposo y en un estado de potencial de acción. En vez de ello, por ejemplo para el segundo armónico frecuencial hay una diferencia de aproximadamente 11 órdenes de magnitud en los dos estados de la célula, porque, en esencia, es detectar directamente el efecto del potencial de la membrana y no todo el cuerpo bacteriano. En la Figura 4 se muestra la respuesta esperada de segundo orden relativo a diferentes frecuencias, con respecto a la frecuencia de bombeo fundamental, en reposo y en un estado de potencial de acción. Además, como es sabido, el tamaño de las bacterias modifica la escala de la respuesta con el cubo del radio; por ende, es más difícil detectar células de 1  $\mu\text{m}$  que las de 10  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 5 se muestra el nivel de las señales de generación de segundos armónicos con respecto a las frecuencias de bombeo en el intervalo de GHz y la potencia de bombeo en el intervalo de mW. Se muestra, como es común para la conversión de frecuencias, la relación no lineal entre la potencia de bombeo y la potencia de los armónicos generados, mientras que la dependencia de la frecuencia de bombeo es más uniforme.

Para una temperatura ambiente típica y un ancho de banda de 10 Hz, el nivel de ruido es aproximadamente -164 dBm, mientras que a niveles de temperatura criogénicos de 4 K el ruido equivalente es de aproximadamente -182 dBm. Además, en la región del campo cercano de los campos electromagnéticos, los niveles de respuesta de los campos eléctricos y magnéticos no son iguales. En particular, se calcula que el campo magnético, más estrechamente relacionado con corrientes, tiene un nivel mayor de respuesta electromagnética para frecuencias más altas, como se muestra en la Figura 7. No obstante, los niveles de intensidad esperados y los niveles de ruido equivalentes son del mismo orden. Puede ser apropiado experimentar con un amplificador criogénico de bajo ruido u otras técnicas similares para detectar tales niveles reducidos de señal para lograr una relación S/R razonable y entrar en los límites de sensibilidad de los detectores.

En las Figuras 8A y 8B las señales de microondas iluminantes están adaptadas a la firma de la dinámica funcional de la partícula biológica, para distinguir estas del potencial que otras señales presentan en el sistema y que no portan información de la dinámica funcional de las partículas biológicas. La Figura 8A muestra en el dominio temporal la firma de señales prevista de la dinámica funcional de las partículas biológicas, las señales de microondas generadas adaptadas a la firma específica, las señales generadas adaptadas a partir de la dinámica funcional de la partícula biológica y la señal detectada que porta información de la dinámica funcional de las partículas biológicas. La Figura 8B muestra en el dominio temporal la firma de señales prevista de la dinámica funcional de las partículas biológicas, las señales de microondas generadas no adaptadas a la firma específica, las señales generadas a partir de la dinámica funcional de la partícula biológica y la señal no detectada que porta información de la dinámica funcional de las partículas biológicas. Obsérvese que la firma de la señal no está a escala, pero ello no es perjudicial para el procedimiento, para mostrar fácilmente las etapas descritas en la presente invención.

El alcance de la presente invención se define en el siguiente pliego de reivindicaciones.

#### Referencias

[1] J. P. Stratford y otros, "Electrically induced bacterial membrane-potential dynamics correspond to cellular proliferation capacity", PNAS, vol. 116, nº 19, pp. 9552-9557, mayo de 2019, doi: 10.1073/pnas.1901788116.

[2] V. Pikov, X. Arakaki, M. Harrington, S. E. Fraser y P. H. Siegel, "Modulation of neuronal activity and plasma membrane properties with low-power millimeter waves in organotypic cortical slices", J. Neural Eng., vol. 7, nº 4, p. 045003, julio de 2010, doi: 10.1088/1741-2560/7/4/045003.

[3] "The Molecular Probes Handbook, 11th Edition". //www.thermofisher.com/es/es/home/references/molecular-probes-the-handbook/mp-handbook-download.html

[4] K. A. Deisseroth, E. A. Ferenczi y P. Hegemann, "Devices, systems and methods for optogenetic modulation of action potentials in target cells", US20190125871A1, 2 de mayo de 2019. Consultado el 23 de enero de 2022. [En

[línea]. Disponible: <https://patents.google.com/patent/US20190125871A1/en?q=membrane+potential&oq=membrane+potential>

5 [5] C. W. C., "Waves and fields in inhomogeneous media", CERN, Document Server, 1995. [En línea]. Disponible: <https://catalogue.library.cern/literature/32bs9-4xw77>

10 [6] T. E. Khattab, "The Effect of High Power at Microwave Frequencies on the Linearity of Non-Polar Dielectrics in Space RF component", International Journal of Communications, Network and System Sciences, vol. 08, nº 02, Art. nº 02, febrero de 2015, doi: 10.4236/ijcns.2015.82002.

[7] R. Richert y W. Huang, "Time-resolved nonlinear dielectric responses in molecular systems", Journal of Non-Crystalline Solids, vol. 356, nº 11, pp. 787-793, abril de 2010, doi: 10.1016/j.jnoncrysol. 2009.08.047.

15 [8] Q. Balzano, "Proposed test for detection of nonlinear responses in biological preparations exposed to RF energy", Bioelectromagnetics, vol. 23, nº 4, pp. 278-287, 2002, doi: 10.1002/bem.10017.

20 [9] "RF nonlinear interactions in living cells-II: Detection methods for spectral signatures — Balzano — 2003 — Bioelectromagnetics — Wiley Online Library". <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bem.10125> (consultado el 12 de Agosto de 2021).

[10] Q. Balzano, V. Hodzic, R. W. Gammon y C. C. Davis, "A doubly resonant cavity for detection of RF demodulation by living cells", Bioelectromagnetics, vol. 29, nº 2, pp. 81-91, 2008, doi: 10.1002/bem.20365.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de señales de microondas que portan información de la dinámica funcional de partículas biológicas, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
    - 5 a) iluminar al menos una partícula biológica con ondas electromagnéticas de microondas, estando comprendidas las ondas electromagnéticas de microondas en un régimen de intensidad no térmica, que tienen frecuencias con longitudes de onda mucho mayores que las dimensiones características de la al menos una partícula biológica y están adaptadas a una firma de la dinámica funcional de la partícula biológica;
    - 10 b) adaptar las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación para producir frecuencias adicionales mediante un proceso paramétrico de conversión al alza de mezcla de frecuencias en una zona de las inmediaciones de una membrana de la partícula biológica con una relación no lineal;
    - 15 c) captar una respuesta afectada por la relación no lineal en diferentes estados funcionales de la partícula biológica; y
    - d) detectar, por medio de un elemento filtrante, las componentes frecuenciales resultantes de la respuesta captada, para inferir a partir de ello la dinámica funcional de la partícula biológica.
  2. El procedimiento según la reivindicación 1 que, además, comprende la adaptación o regulación de las ondas electromagnéticas de microondas a un medio dado que contiene la al menos una partícula biológica, incluyendo dicho medio dado un alcohol, un tampón biológico iónico o un polímero líquido.
  3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2 en donde la relación no lineal comprende una relación no lineal de corriente-tensión que produce un potencial de tensión en una superficie de contacto de la membrana de la partícula biológica.
  - 25 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación se emplean a una potencia muy por debajo de un umbral que pueda provocar daños térmicos en la partícula biológica.
  5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación se emplean de modo que la duración de la iluminación esté adaptada a la dinámica funcional temporal de la partícula biológica.
  - 30 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde las frecuencias de las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación son reguladas a las resonancias de la dinámica de la partícula biológica.
  7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que, además, comprende una etapa de aislamiento de las frecuencias fundamentales de las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación, ya sea espacialmente o en frecuencia.
  - 35 8. Un sistema de detección de señales de microondas que portan información de la dinámica funcional de partículas biológicas que comprende:
 

al menos una partícula biológica;

  - 40 un generador de microondas configurado para producir ondas electromagnéticas de microondas para iluminar al menos una partícula biológica, estando comprendidas las ondas electromagnéticas de microondas en un régimen de intensidad no térmica, que tienen frecuencias con longitudes de onda mucho mayores que las dimensiones características de la al menos una partícula biológica y están adaptadas a una firma de la dinámica funcional de la partícula biológica;
  - 45 un adaptador de iluminación configurado para adaptar las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación para producir frecuencias adicionales a través de un proceso paramétrico de conversión al alza de mezcla de frecuencias en una zona de las inmediaciones de una membrana de la partícula biológica con una relación no lineal;
  - 50 un detector de microondas configurado para captar una respuesta afectada por la relación no lineal en diferentes estados funcionales de la partícula biológica; y
  - un elemento filtrante configurado para detectar las componentes frecuenciales resultantes de la respuesta captada.
- 55 9. El sistema según la reivindicación 8 que, además, comprende un elemento de aislamiento espacial o frecuencial configurado para aislar las frecuencias fundamentales de las ondas electromagnéticas de microondas de iluminación.

10. El sistema según la reivindicación 8 o 9 en donde el generador de microondas está adaptado para emitir impulsos y funcionar de modo que la duración de la iluminación se regule a la dinámica funcional temporal de la partícula biológica.
- 5 11. El sistema según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 8 a 10 en donde el adaptador de iluminación y el detector de microondas están situados de forma ya sea mutuamente colineal o adyacente, o cada uno a un lado de la partícula biológica.
12. El sistema según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 8 a 11 en donde el elemento filtrante es un filtro de frecuencias de paso alto.
- 10 13. El sistema según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 8 a 11 en donde el elemento filtrante comprende un receptor de filtro adaptado configurado para aprovechar esquemas de procesamiento de señales.
14. El sistema según la reivindicación 13 en donde los esquemas de procesamiento de señales están basados en la cancelación interferométrica de productos de intermodulación pasiva.
15. El sistema según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 8 a 14 en donde el detector de microondas está basado en esquemas de detección electromagnética cuántica sensible.

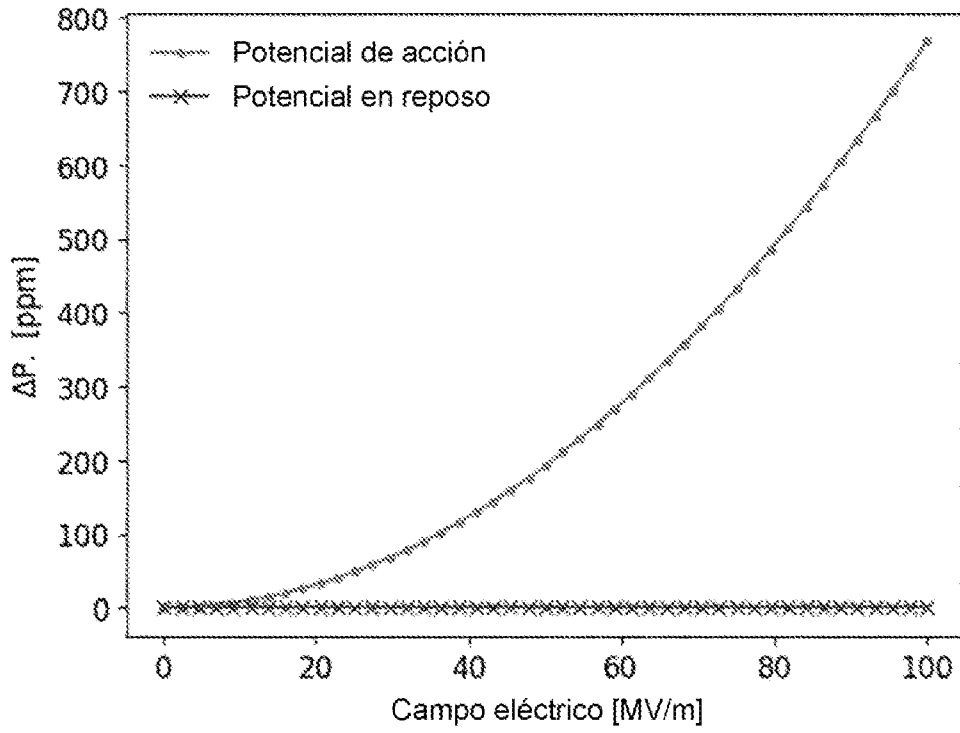


FIG. 1

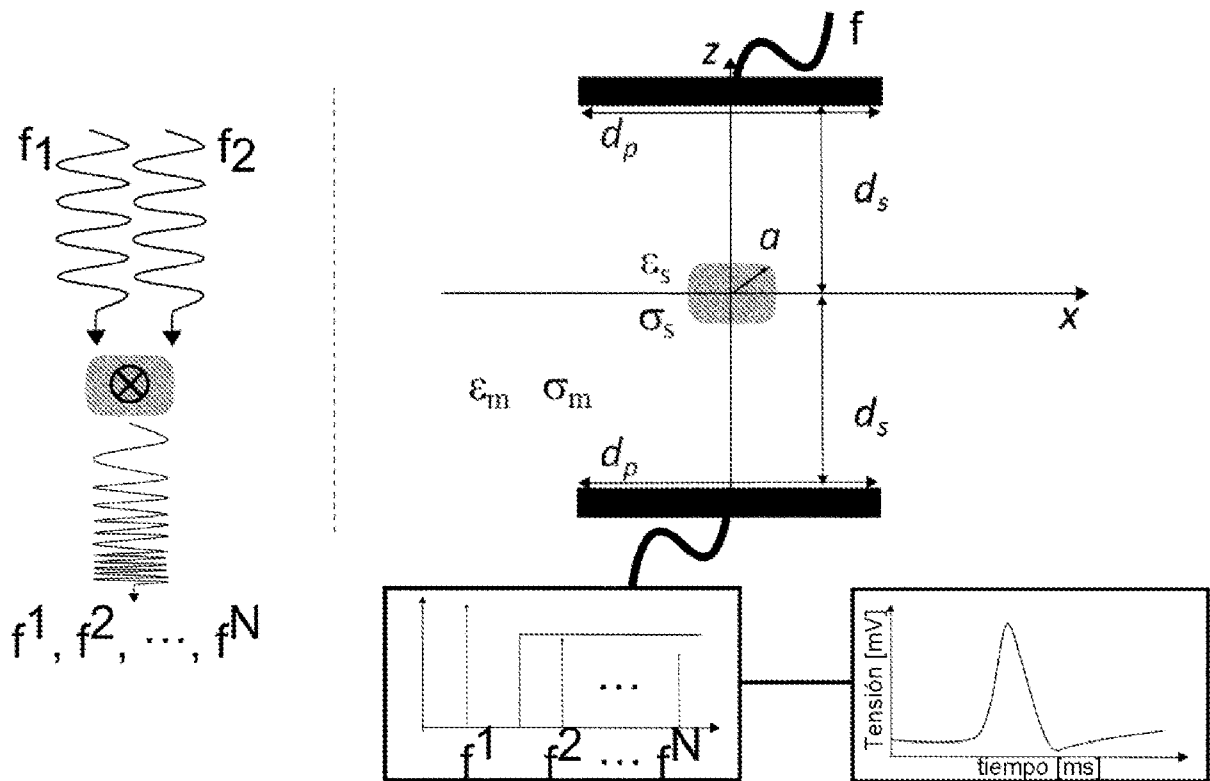


FIG. 2

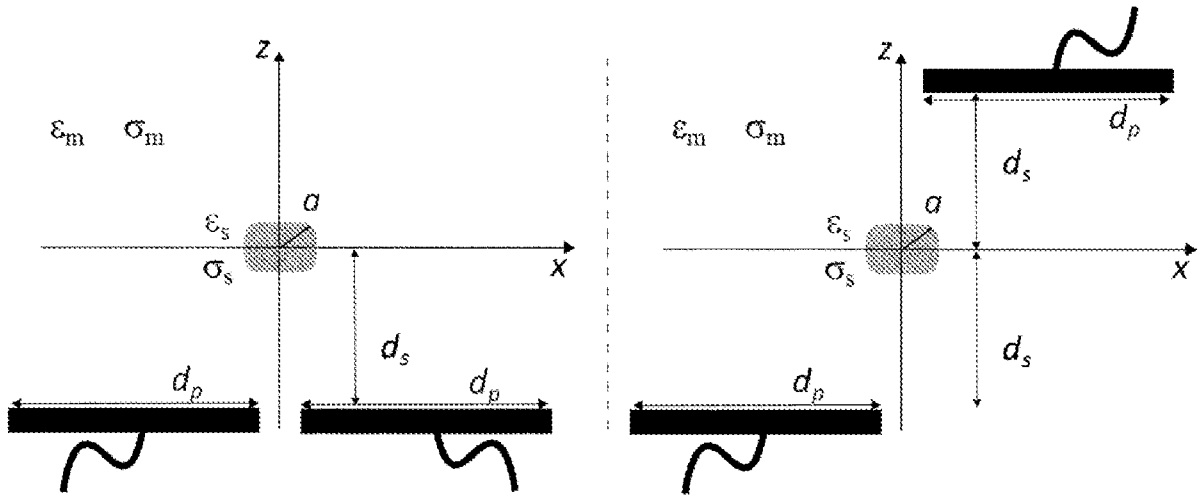


FIG. 3

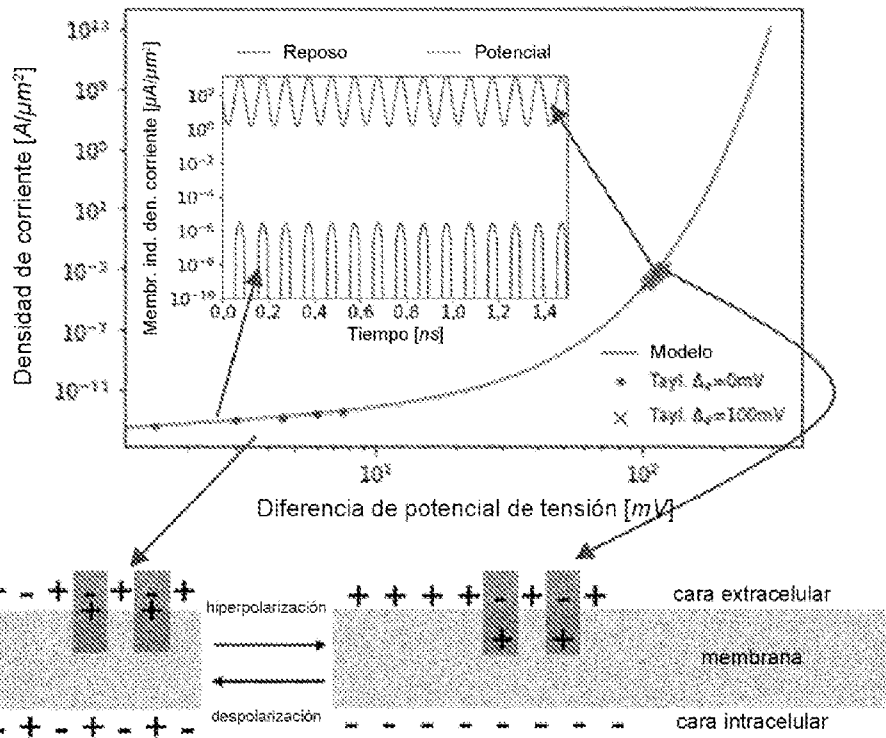
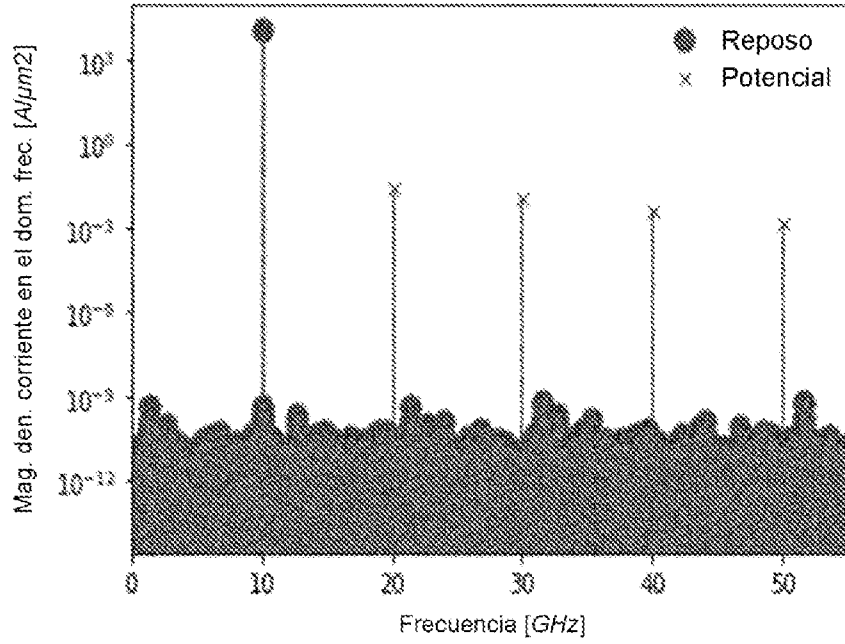
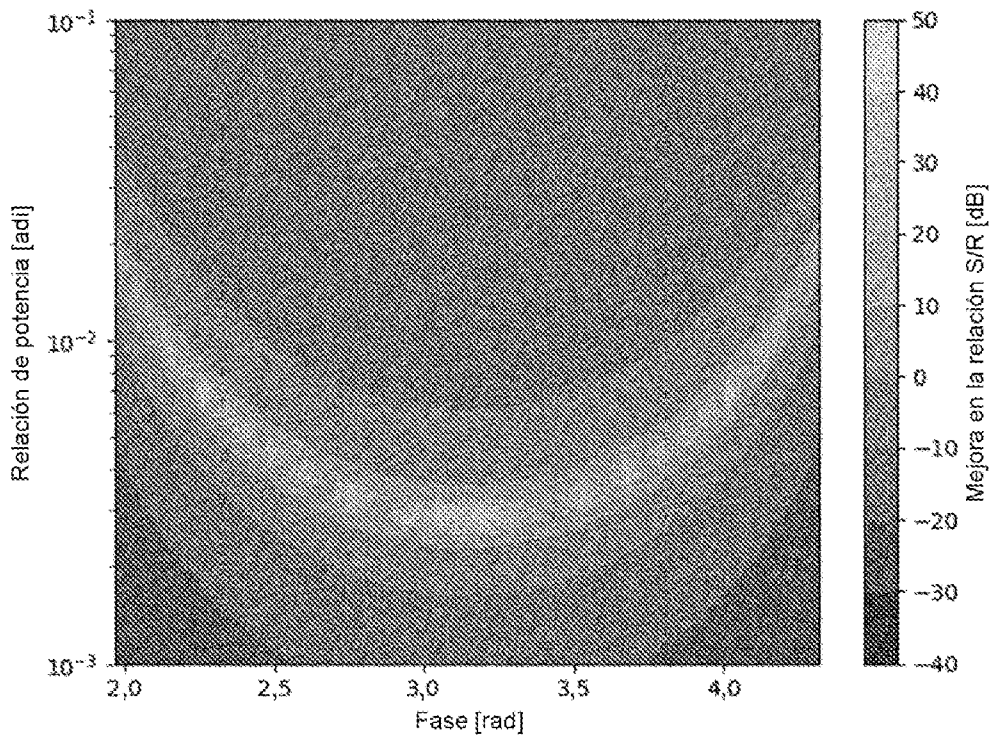


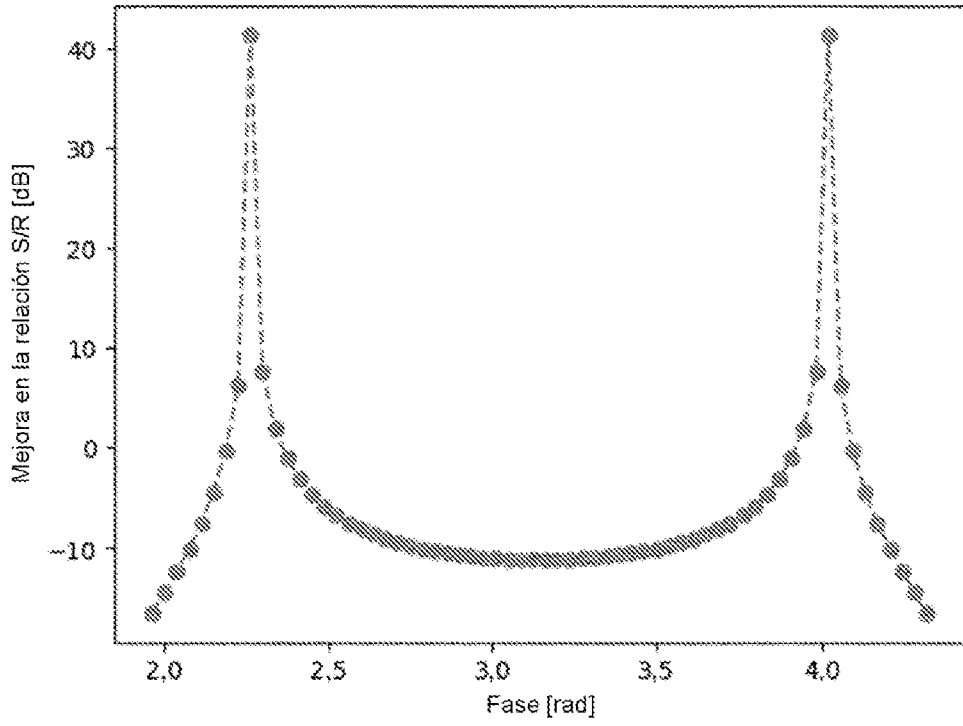
FIG. 4



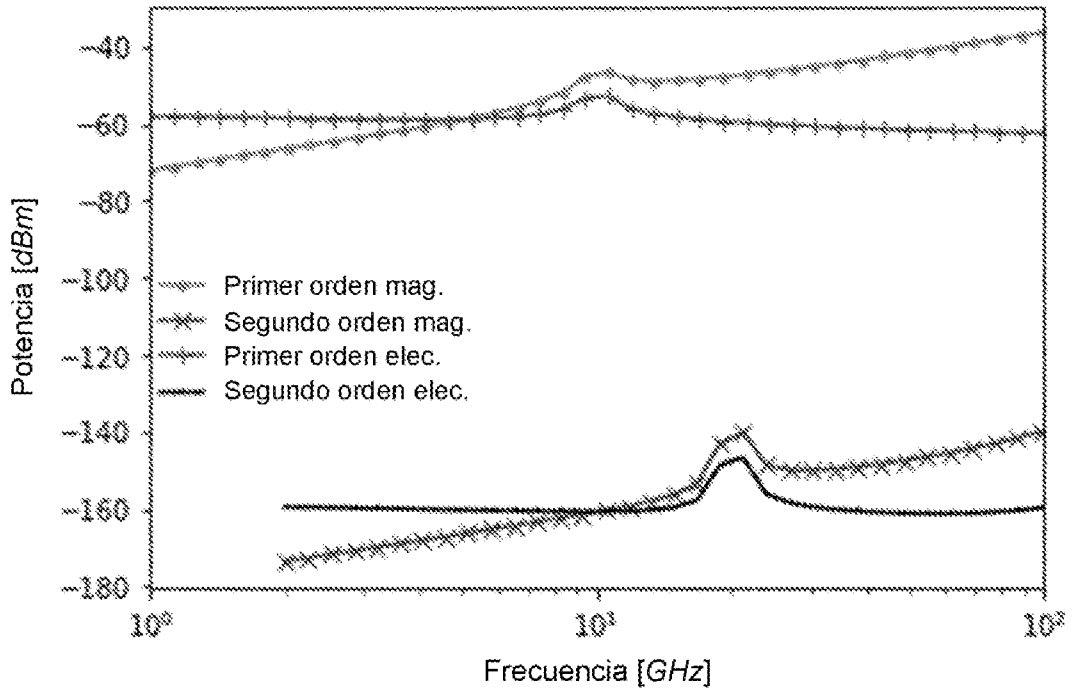
**FIG. 5**



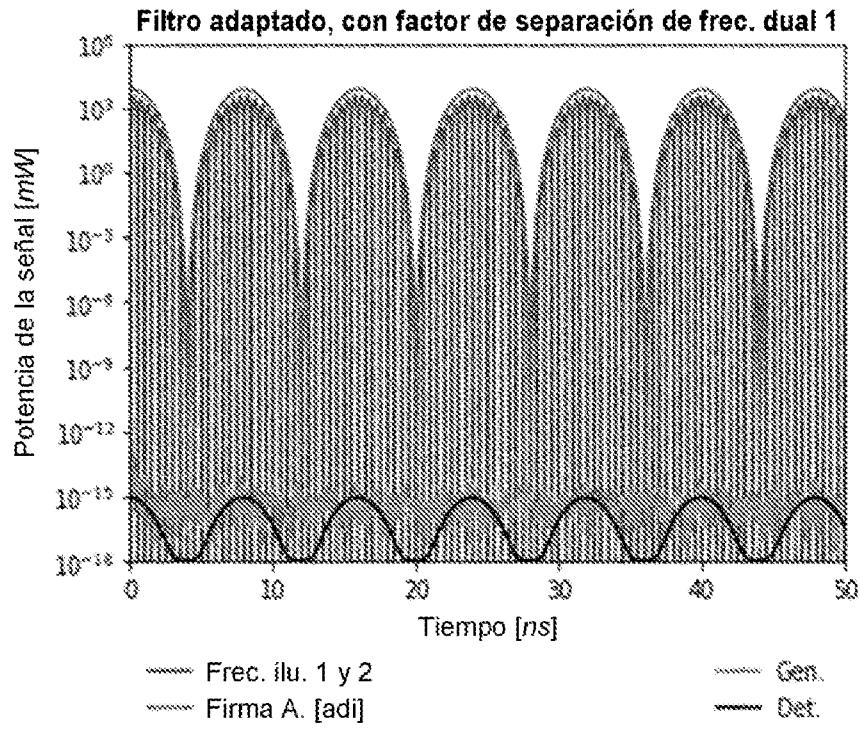
**FIG. 6A**



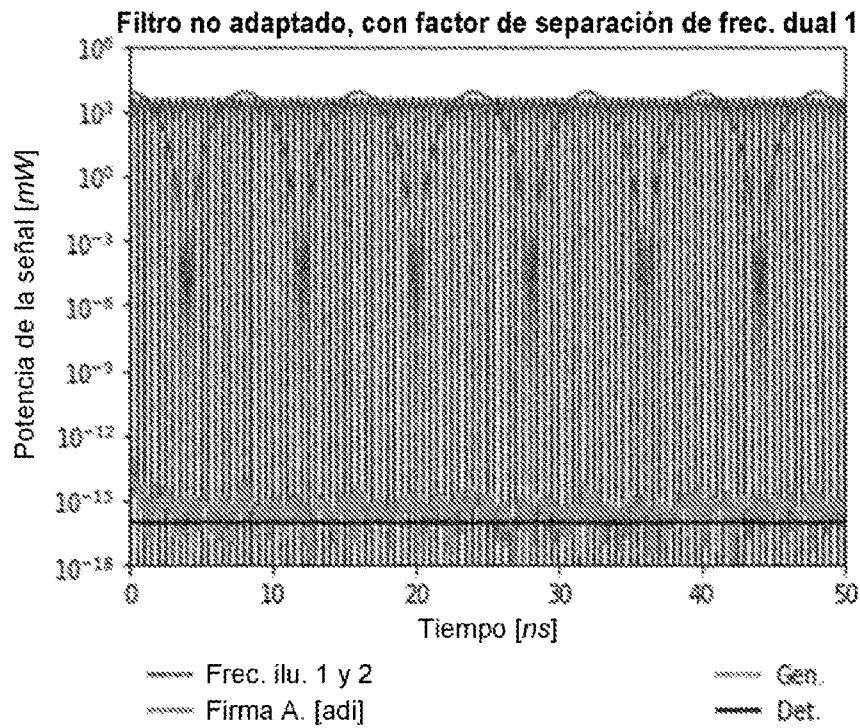
**FIG. 6B**



**FIG. 7**



**FIG. 8A**



**FIG. 8B**