

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 352 482**

21 Número de solicitud: 200801973

51 Int. Cl.:  
**C12M 1/34** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **01.07.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.02.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**21.02.2011**

71 Solicitante/s: **Universidad Complutense de Madrid  
Avda. de Séneca, nº 2  
28040 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Crespo del Arco, Patricia;  
Presa Muñoz de Toro, Patricia Marcel;  
Valdés Tamames, Javier José;  
Cañete Gucel, Magdalena;  
Morales Herrero, María del Puerto;  
Villanueva Oroquieta, María de los Ángeles;  
Multigner Domínguez, Marta;  
Rivero Rodríguez, Guillermo y  
Spottorno Giner, Jorge**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Dispositivo para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular "in situ" basado en un sensor magnetoelástico.**

57 Resumen:

Dispositivo para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular "in situ" basado en un sensor magnetoelástico.

El dispositivo comprende un recipiente de material biocompatible y que está formado por uno o varios compartimentos independientes donde se introducen los elementos magnetostrictivos que forman el sensor; dicho sensor incluye uno o más elementos ferromagnéticos magnetostrictivos. El recipiente está diseñado de manera que puede contener un medio de cultivo celular. Además, el dispositivo incluye un sistema de medida para medir la respuesta del sistema de excitación-captación. La medida se realiza "in situ" sin necesidad de extraer el cultivo celular de la cámara de incubación.

ES 2 352 482 A1

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular “*in situ*” basado en un sensor magnetoelástico.

## Sector de la técnica

La presente invención se enmarca dentro del sector de Sensores Magnéticos y Materiales Magnéticos con aplicaciones en el campo de la Biología Celular. Más concretamente se refiere a un sensor magnetoelástico basado en la variación de la frecuencia de resonancia de un material magnetostrictivo en función de su masa.

## Estado de la técnica

Los materiales amorfos magnetostrictivos presentan una propiedad física que los hace especialmente atractivos desde el punto de vista de su utilización como elementos sensores. Dicha propiedad es la existencia del fenómeno de la resonancia magnetoelástica cuando son sometidos a campos magnéticos variables con el tiempo. La frecuencia a la cual aparece la resonancia magnetoelástica depende de la composición del material, de la temperatura y de sus dimensiones físicas y de su masa.

Se denomina magnetostricción a la dependencia de las dimensiones de un sólido con su estado de imanación. Se dice que la magnetostricción de una sustancia es positiva o negativa según se alargue en la dirección de la imanación espontánea o en la perpendicular, respectivamente. El alargamiento tiene asociado una energía elástica que ha sido suministrada por el campo magnético, esto es, por la energía de imanación. El cociente entre la energía elástica almacenada y el trabajo de imanación suministrado se conoce como coeficiente de acoplamiento magnetoelástico  $k$  y es el índice que mide la calidad de un material para operar como transductor. Los materiales magnéticos amorfos son magnetostrictivos y presentan el valor  $k=0,99$ , el más grande observado (Magnetostriction: Theory and Applications of Magnetoelasticity, E. du Trémolet de Lacheisserie, CRC Press Inc, Boca Ratón (1993)). Debido a esta naturaleza presentan lo que se conoce como resonancia magnetoelástica. Este es el fenómeno que se produce cuando la frecuencia del campo magnético aplicado sobre un material magnetoelástico coincide con la frecuencia mecánica propia del mismo. Este principio puede ser utilizado para la realización de sensores y biosensores inalámbricos magnetoelásticos. Cuando se genera un flujo magnético de una determinada frecuencia las vibraciones mecánicas del sensor pueden ser detectadas bien por métodos acústicos o midiendo las variaciones de impedancia en un inductor. El dispositivo objeto de la presente invención está basado en la medida de la variación de la impedancia del sistema excitador-captador. Como la permeabilidad del sensor aumenta en el momento de la resonancia, la frecuencia de resonancia puede determinarse a partir de la máxima variación de impedancia del sistema excitador-captador.

La evolución del progreso de un cultivo celular se realiza, tradicionalmente, a partir de la observación directa de la evolución que tiene lugar en un sustrato de cultivo (soporte sobre el que se colocan físicamente las células) mediante un microscopio. Es fundamental tener perfectamente controlado el microambiente en el que se desarrolla el cultivo para poder asegurar que cualquier cambio en el comportamiento de las células solo es atribuible al comportamiento celular en cada situación concreta y no a unas deficientes condiciones de cultivo. Generalmente los cultivos se realizan dentro de cámaras de incubación donde es posible controlar factores tales como la humedad, pH, temperatura, etc. El estricto control de la temperatura es muy importante al tratarse de un factor crítico en la mayoría de los experimentos con células, especialmente de mamíferos. Sin embargo, a la hora de observar mediante el microscopio la evolución de las células del cultivo es necesario extraer el sustrato del cultivo de la cámara lo que puede producir daños indeterminados debidos a los cambios de temperatura, aparte de daños mecánicos, que tienen lugar en cada medida.

Existen varios sensores magnetoelásticos diseñados para la medida de la densidad y viscosidad (C.A. Grimes *et al.*, Review of Scientific Instruments 71 (10), 2000), para la medida de la temperatura y humedad (M.K. Jain, Smart Mater Struct. 9, 502 (2000) y para la detección de antígenos (R. Guntupalli *et al.*, Biosensors and Bioelectronics 22, 1474 (2007)).

En la patente US6397661B1 se describe un aparato diseñado para medir las variaciones de una o varias propiedades físicas (masa, viscosidad, temperatura y rigidez, principalmente) de una sustancia, junto con el método empleado para obtener las mediciones. El aparato está compuesto, en todas las configuraciones descritas, por al menos un sensor de material magnetostrictivo, sobre el cual se coloca la sustancia cuyas propiedades se desea determinar, y un receptor para detectar la intensidad de la onda magneto-elástica emitida al incidir un campo magnético dependiente del tiempo sobre el sistema.

Hasta donde nuestro conocimiento alcanza no existe ningún método de medida la evolución de un cultivo celular “*in situ*”, es decir, sin necesidad de extraer el sustrato de cultivo de la cámara de incubación y de forma continua. La presente invención solventa las limitaciones de los métodos tradicionales de estudio de la evolución de los cultivos celulares que se acaban de exponer.

## Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo para la medida de la variación de la masa que tiene lugar en un cultivo celular con el tiempo, mediante la medida de la variación de la frecuencia de resonancia magnetoelástica de los

## ES 2 352 482 A1

materiales magnetostrictivos que forman parte del sensor. Dicha medida se realiza “*in situ*”, sin necesidad de extraer el cultivo de la cámara de incubación ni de realizar conexiones físicas entre el recipiente donde crecen las células y el sistema de medida de la variación de la masa.

5 El dispositivo comprende:

a) Un recipiente fabricado con material biocompatible, o bien cuya superficie sea de un material biocompatible, diseñado para albergar en su interior el sensor magnetoelástico. El recipiente está formado por uno o varios compartimentos independientes donde se introducen los materiales magnetostrictivos que forman el sensor. Además, el  
10 recipiente está diseñado de manera que puede contener un medio de cultivo celular.

b) Un sensor magnetoelástico que incluye uno o más materiales ferromagnéticos magnetostrictivos de dimensiones adecuadas para estar incluidos en el recipiente descrito en el apartado (a) y que presentan una frecuencia de resonancia magnetoelástica conocida. Los materiales ferromagnéticos magnetostrictivos pueden tener forma de cinta, de película  
15 delgada o cualquier otra forma que permita su inclusión en el recipiente y la adherencia de las células sobre los mismos;

c) Un sistema de excitación-captación que permite aplicar un campo electromagnético alterno sobre el elemento sensor y detectar simultáneamente la variación del flujo magnético;

d) Un sistema de medida que permite medir, para cada frecuencia, la respuesta del sistema de excitación-captación y determinar la frecuencia de resonancia magnetoelástica de los distintos elementos ferromagnéticos magnetostrictivos que comprende el sensor.

25 Dentro del recipiente diseñado para el dispositivo, en los compartimentos diseñados a tal efecto, se colocan uno o más materiales magnetostrictivos de manera que queden sumergidos en el medio de cultivo cuando éste se añada. Cuando se incluye más de un material magnetostrictivo en un único dispositivo, cada elemento magnetostrictivo se coloca en un compartimento diferente. Por otro lado, una opción es que uno de los materiales magnetostrictivos actúe como referencia para poder evaluar los cambios en la frecuencia de resonancia magnetoelástica debidos  
30 a posibles cambios de temperatura u otros factores no relacionados directamente con la progresión del cultivo celular. Sobre el resto de los materiales magnetostrictivos se deposita una muestra de las células cuya evolución y crecimiento se desea estudiar de forma que actúan como sustratos del cultivo celular. Mediante el sistema de excitación-captación se aplica un campo electromagnético alterno sobre el sensor y se recogen las variaciones del flujo magnético producido por el sensor. El sistema de excitación-captación puede comprender un sistema de bobinas. El sistema de excitación-captación permite variar la frecuencia del campo electromagnético que actúa sobre el sensor y recoger la respuesta del sensor en función de la frecuencia. Cuando la frecuencia del campo electromagnético aplicado coincide con la frecuencia de resonancia magnetoelástica de alguno de los materiales ferromagnéticos magnetostrictivos, la transformación de energía magnética en elástica es máxima y el material entra en resonancia magnetoelástica. Esta resonancia se detecta mediante el sistema de excitación-captación a partir de la variación de la fuerza electromotriz (fem) inducida. La medida simultánea de la tensión aplicada por el sistema de excitación-captación y de la intensidad inducida debido a la variación de la fem en el sistema de excitación-captación permite conocer la impedancia del sistema de excitación-captación. A partir de la medida de la impedancia en función de la frecuencia se determina la frecuencia de resonancia magnetoelástica de los elementos magnetostrictivos del sensor.

45 Al variar el número de células sobre los elementos magnetostrictivos, varía la masa del material magnetostrictivo y esto se traduce en un cambio en su frecuencia de su resonancia magnetoelástica. La variación de la frecuencia de resonancia magnetoelástica al variar la masa de un material magnetostrictivo en una cantidad  $\Delta m$  viene dada por

50 
$$\Delta f = -f \frac{\Delta m}{2M}$$
, donde  $f$  es la frecuencia de resonancia inicial,  $M$  es la masa inicial,  $\Delta m$  es el cambio de masa y  $\Delta f$

es la variación en la frecuencia de resonancia.

55 Por otro lado, el elemento magnetostrictivo se puede recubrir con sustancias favorecedoras de la adherencia celular para favorecer el crecimiento del cultivo.

Este dispositivo que permite monitorizar el crecimiento celular resuelve los problemas que presenta actualmente la observación del crecimiento de los cultivos celulares en cuanto a los cambios de temperatura que sufren las células al tener que sacarlos de las cámaras de incubación:

60 i) el dispositivo se puede introducir en cámaras de cultivo convencionales, con lo que el seguimiento de la variación de masa se realiza “*in situ*”, es decir, sin extraer el cultivo de la cámara de incubación. Los métodos tradicionales de seguimiento de la evolución de los cultivos celulares se basan en la observación directa del cultivo mediante un microscopio. Con el dispositivo objeto de la invención, no es necesario extraer el cultivo de la cámara de incubación  
65 por lo que se evitan los daños mecánicos que pueda sufrir el cultivo así como cualquier efecto indeterminado debido a los cambios de temperatura que se producen al extraer el cultivo de la cámara. Además, el hecho de que el elemento sensor esté inmerso en el medio de cultivo permite realizar un seguimiento continuo;

ii) el diseño del recipiente y del sensor cuando se utilizan dos o más elementos magnetostrictivos permite que uno de dichos elementos actúe como referencia de forma que es posible monitorizar en todo momento los cambios de, por ejemplo, temperatura que puedan tener lugar en el cultivo celular, ya que la frecuencia de resonancia magnetoelástica depende de la temperatura. Esto permite distinguir la contribución debida al cambio en la masa del material magnetostrictivo (producida al evolucionar el cultivo celular) de la contribución debida a la temperatura en el cambio en la frecuencia de resonancia del material magnetostrictivo;

iii) la detección de la frecuencia de resonancia se hace sin necesidad de realizar conexiones físicas directas.

## 10 Breve descripción de las figuras

Para facilitar la comprensión de las principales características de la invención y formando parte integrante de esta memoria descriptiva, se acompañan una serie de figuras. Con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:

15 Figura 1. Vista superior del recipiente diseñado para realizar el cultivo celular, incluyendo el sistema de bobinas que está integrado en la parte exterior inferior del recipiente, según se detalla en el ejemplo.

20 Figura 2: Diagrama de bloques de la realización del dispositivo descrita en el ejemplo, incluyendo el sistema electrónico de detección.

## Modo de realizar la invención

Habiendo descrito la presente invención, se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo, que no es limitativo de su alcance; dicho alcance viene definido exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

### Ejemplo

Se diseñó un recipiente de cultivo celular para albergar dos piezas de material magnetostrictivo en forma de cinta magnetostrictiva (3) y (4) que eran dos piezas de una cinta amorfa ferromagnética y presentaban la misma frecuencia de resonancia magnetoelástica. El sistema de excitación-captación estaba formado por dos bobinas conectadas en serie-oposición e integrado en la parte inferior y exterior del recipiente. El recipiente constaba de dos zonas aisladas (1) y (2). En cada zona se introdujo una de las cintas (3) y (4) sobre soportes diseñados a tal efecto. A continuación se introdujo el medio de cultivo celular en el recipiente. Sobre una de las cintas magnetostrictivas (3) se depositó una muestra de las células cuya evolución y crecimiento se deseaba investigar, mientras que la otra cinta (4) quedó sumergida en el medio de cultivo. De esta forma, una de las cintas actuaba como soporte o sustrato del cultivo celular, mientras que la otra actuaba como referencia.

El recipiente se cerró de forma que se garantizara un perfecto control del microambiente y que cualquier cambio en el cultivo fuera solo atribuible al comportamiento celular en la situación concreta bajo estudio y no a unas deficientes condiciones de cultivo.

El recipiente se colocó sobre un sistema de dos bobinas conectadas en serie oposición (5). Mediante una de las bobinas se aplicó un campo electromagnético alterno de frecuencia  $\omega$  y mediante la otra bobina se midió la intensidad inducida en el sistema de bobinas para esa frecuencia. La medida simultánea de la tensión aplicada y de la intensidad inducida permitió conocer la variación de impedancia del sistema formado por las dos bobinas.

Para ello se utilizó un sistema electrónico diseñado a tal efecto y cuyo diagrama de bloques se muestra en la Figura 2. Mediante un dispositivo DDS (6) (Direct Digital Synthesizer) (Sintetizador digital-directo) se generaron los valores de dos señales sinusoidales en cuadratura ( $\text{sen}\omega t$  y  $\text{cos}\omega t$ ), es decir, desfasadas  $\pi/2$ . Mediante una referencia de tensión (7) se generó una tensión estable para uso de los convertidores D/A (Digital-Analógico) (8) y A/D (Analógico-Digital) (11). La señal sinusoidal  $\text{sen}\omega t$  generada por la referencia de tensión (7) se transformó en una señal analógica por el convertidor D/A (Digital-Analógico) (8) que se amplificó mediante un amplificador de potencia (9). La señal amplificada alimentó el sistema de excitación/captación (5) formado por dos bobinas conectadas en serie oposición, que generaban un campo magnético de frecuencia  $\omega$  que excitaba a las cintas magnetostrictivas (3) y (4). Al mismo tiempo, las bobinas permitieron recoger la respuesta del sensor magnetoelástico.

Cuando la frecuencia  $\omega$  de la señal excitadora coincidía con la frecuencia de resonancia magnetoelástica del sensor magnetoelástico, se producía la conversión de energía magnética en energía elástica y el sensor experimentaba una resonancia magnetoelástica que se detectaba mediante la bobina captadora.

Las variaciones en la fuerza electromotriz (tensión) inducida en el sistema de excitación/captación se tradujeron en variaciones de intensidad mediante un convertidor de intensidad/tensión (10). Mediante el convertidor Analógico/Digital (11) se obtuvo la medida digital de la intensidad que pasaba por las bobinas excitadoras. El Procesador Digital de Señal (12) permitió extraer las componentes en fase y cuadratura de la intensidad medida por el convertidor Analógico/Digital (11) y mediante un ordenador de control y adquisición de datos (13) se obtuvo para cada frecuencia el módulo de la impedancia de las bobinas excitadoras/captadoras (5) lo que permitió medir la frecuencia a la que resonaba el conjunto formado por las bobinas y el sensor magnetoelástico (3) y (4).

REIVINDICACIONES

5 1. Dispositivo para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular “*in situ*”, basado en un sensor magnetoelástico, que comprende:

i) un recipiente fabricado con material biocompatible, o bien cuya superficie sea de un material biocompatible, que tiene uno o más compartimentos independientes;

10 ii) un sensor magnetoelástico que incluye al menos un material ferromagnético magnetostrictivo;

iii) un sistema de excitación-captación que genera un campo electromagnético alterno y detecta la respuesta inducida en el propio sistema;

15 iv) un sistema de medida de la respuesta del sistema de excitación-captación en función de la frecuencia.

2. Dispositivo para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular “*in situ*” basado en un sensor magnetoelástico, según la reivindicación 1, donde el recipiente tiene más de un compartimento independiente y el sensor incluye un elemento magnetostrictivo en al menos dos de dichos compartimentos.

20 3. Dispositivo para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular “*in situ*” basado en un sensor magnetoelástico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde los materiales magnetostrictivos tienen forma de cinta.

25 4. Dispositivo para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular “*in situ*” basado en un sensor magnetoelástico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde los materiales magnetostrictivos son películas delgadas magnetostrictivas.

30 5. Dispositivo para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular “*in situ*” basado en un sensor magnetoelástico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sistema de excitación-captación está constituido por una o más bobinas.

35 6. Dispositivo para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular “*in situ*” basado en un sensor magnetoelástico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la superficie de los materiales magnetostrictivos se ha recubierto con sustancias favorecedoras de la adherencia celular.

40 7. Dispositivo para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular “*in situ*” basado en un sensor magnetoelástico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la medida se realiza sin conexiones físicas entre el dispositivo y el sistema de medida.

8. Método para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular “*in situ*” que comprende:

45 - aplicar, mediante un sistema de excitación-captación, un campo electromagnético alterno sobre un sensor magnetoelástico cuyos elementos están colocados en uno o más de los compartimentos independientes de un recipiente fabricado con material biocompatible, o bien cuya superficie sea de un material biocompatible, donde dicho recipiente contiene un medio de cultivo celular y en al menos uno de los compartimentos independientes se han incluido células;

50 - detectar, mediante el sistema de excitación-captación, la respuesta del propio sistema de excitación-captación;

- medir, mediante un sistema de medición, la respuesta del sistema de excitación-captación;

- determinar la frecuencia de resonancia magnetoelástica de los distintos elementos ferromagnéticos magnetostrictivos que comprende el sensor.

55 10. Método para la medida de la evolución de la masa de un cultivo celular “*in situ*”, según la reivindicación 9, donde al menos dos compartimentos independientes contienen cada uno un elemento del sensor magnetoelástico, uno de dichos compartimentos no contiene células, y el elemento del sensor magnetoelástico incluido en dicho compartimento sin células actúa como referencia para la medición de cambios en la frecuencia de resonancia magnetoelástica no relacionados directamente con el aumento de la masa del cultivo celular.

60

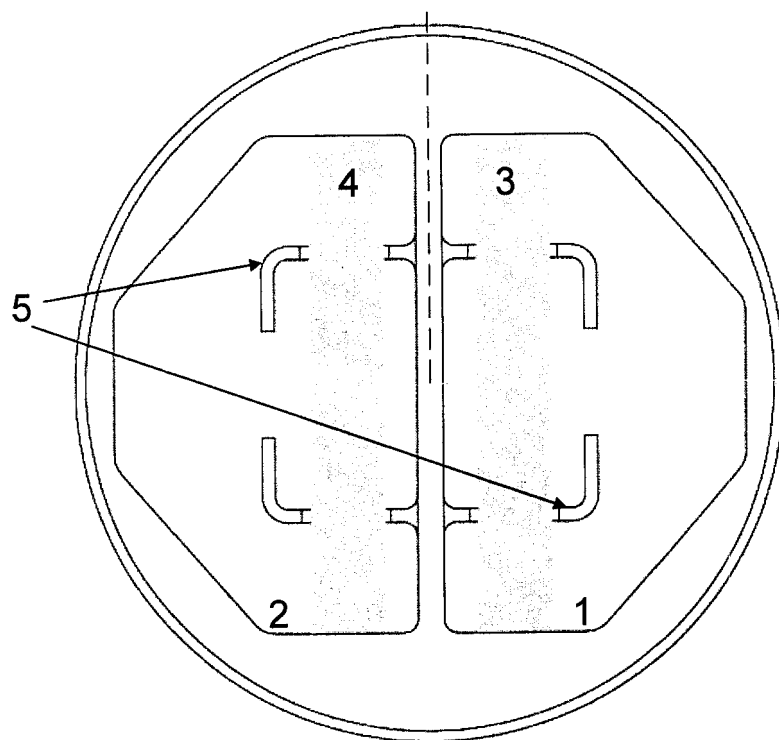


Fig. 1

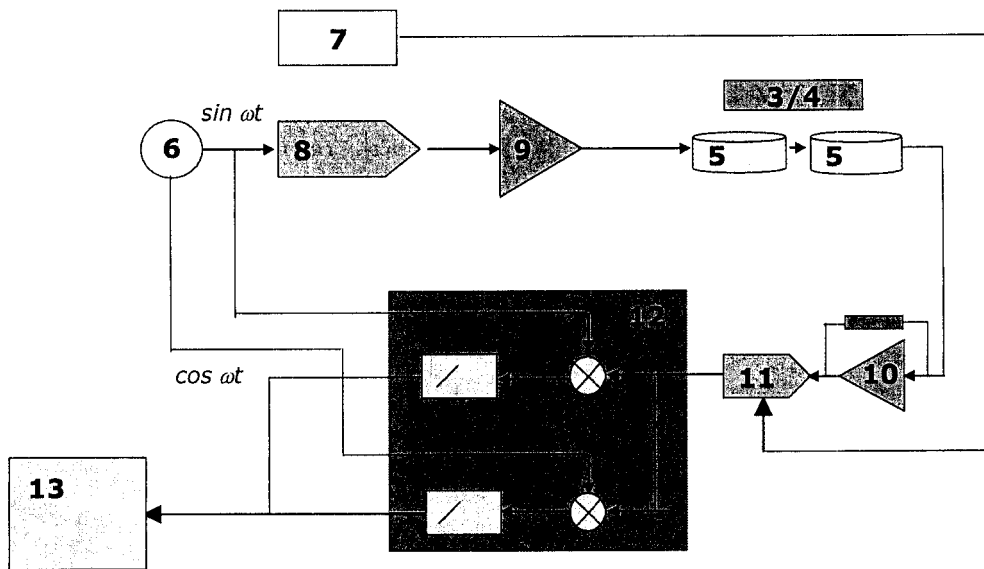


Fig. 2



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 200801973

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 01.07.2008

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12M1/34** (01.01.2006)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HUANG, S et al. A wireless, remote-query sensor for real-time detection of Escherichia coli O157:H7 concentrations. Sensors and actuators B, Vol. 131, No. 2, 01.02.2008, páginas 489-495, ISSN 0925-4005, <DOI: 10.1016/j.snb.2007.12.036>	1-10
X	PANG, P et al. Detection of Pseudomonas aeruginosa using a wireless magnetoelastic sensing device. Biosensors and Bioelectronics, Vol. 23, No. 2, 21.07.2007, páginas 295-299, ISSN 0956-5663, <DOI: 10.1016/j.bios.2007.07.004>	1-10

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
04.02.2011

Examinador  
A. Figuera González

Página  
1/2



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

C12M

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTEN, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE