

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 640**

21 Número de solicitud: 201630443

51 Int. Cl.:

G01G 3/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

11.04.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.11.2017

71 Solicitantes:

NANODREAMS, S.L. (50.0%)

C/ Ercilla, 17-3

48009 Bilbao (Bizkaia) ES y

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

MALVAR VIDAL, Oscar;

RUZ MARTINEZ, Jose Jaime;

MONTEIRO KOSAKA, Priscila;

CALLEJA GOMEZ, Montserrat y

TAMAYO DE MIGUEL, Francisco Javier

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Procedimiento para obtener la posición de adsorción, la masa y la rigidez de una partícula**

57 Resumen:

Procedimiento para obtener la posición de adsorción, la masa y la rigidez de una partícula depositada sobre la superficie de un resonador a partir del cambio relativo en la frecuencia de resonancia de dicho resonador en 3 o 4 modos flexurales de vibración. La rigidez de las partículas resulta de gran interés en el estudio de células y otros compuestos biológicos que cambian de estado sin cambiar significativamente de masa.

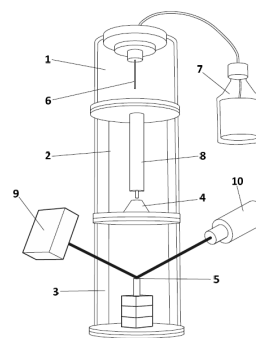


FIG. 1

DESCRIPCION

Procedimiento para obtener la posición de adsorción, la masa y la rigidez de una partícula

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con la espectrometría de masas, en particular con el uso de micro-palancas o puentes y sus distintos modos de vibración para la obtención de parámetros de interés como la masa.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La espectrometría de masas (MS) mide la relación entre masa y carga con alta precisión en especies moleculares entre 100 Da y 100 kDa. Sin embargo, los procedimientos clásicos no ofrecen suficiente rendimiento con partículas de mayor masa como células, bacterias o virus. Nuevas estructuras nanomecánicas resonantes como las palancas o puentes (NEMS, de “Nanoelectromechanical Systems”) permiten medir la masa de objetos intactos por encima de 100 kDa, por lo que estas estructuras se consideran especialmente apropiadas para el estudio de complejos biológicos y nanopartículas. En la espectrometría de masas nanomecánica la muestra se introduce mediante un sistema de ionización por electro spray (conocido como ESI, “electrospray ionization”) y los iones resultantes se guían mediante un sistema electrostático hacia una cámara de alto vacío ($<10^{-5}$ Torr) donde se sitúa el resonador. Alternativamente se puede utilizar la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI, “matrix assisted laser desorption ionization”) para llevar la muestra al resonador. A medida que la muestra es adsorbida por el resonador, se producen cambios bruscos en su frecuencia de resonancia, cambios que son proporcionales a la masa de dicha partícula con una constante de proporcionalidad que depende de la posición de adsorción. Puesto que la resonancia es independiente de la carga de la partícula, el análisis de los datos se simplifica. La deconvolución de la posición de adsorción a lo largo del NEMS y de la masa requiere la medición simultánea de al menos dos modos de vibración, como proponen Dohn et al. en “Mass and position determination of attached particles on cantilever based mass sensors”, (*Review of Scientific Instruments* 78, 103303, 2007) y se describe en la solicitud de patente US2014/0156224. Estos procedimientos, sin embargo, no permiten el cálculo de la rigidez, un parámetro que ha sido ignorado hasta la fecha por considerarse de nula influencia a la hora de

calcular la masa.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 La presente invención supera el prejuicio técnico descrito anteriormente y va un paso más allá en el cálculo de parámetros de interés al incluir la rigidez de las partículas, lo cual resulta de gran interés en el estudio de células y otros compuestos biológicos que cambian de estado sin cambiar significativamente de masa (por ejemplo, células sanas vs. células cancerígenas). Así, la invención consiste en un procedimiento para obtener la posición de adsorción, la
10 masa y la rigidez de una partícula depositada sobre la superficie de un resonador nanomecánico (palanca o puente) a partir de los cambios en frecuencia de 3 o 4 modos flexurales de vibración. Las partículas pueden ser partículas inorgánicas, virus, bacterias, proteínas o células.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo y para complementar esta descripción, se acompaña como parte integrante de la misma las siguientes figuras,
20 cuyo carácter es ilustrativo y no limitativo:

La figura 1 es un esquema de un sistema de espectroscopia de masas que puede ser utilizado para llevar a cabo el procedimiento de la invención.

La figura 2 muestra la micro-palanca con mayor detalle.

25 La figura 3 es un dibujo esquemático de la técnica de deflexión del haz utilizada para medir las frecuencias de resonancia.

La figura 4 es una gráfica que muestra la masa de las partículas teniendo en cuenta la rigidez frente a la masa calculada sin tener en cuenta la rigidez y la masa proporcionada por el fabricante (línea continua).

30 La figura 5 es una gráfica de la relación entre el término de rigidez y término de masas ($\epsilon = \frac{\Delta_s}{\Delta_m} = \frac{\rho_c \chi_e E_a}{E_c \rho_a}$) de las partículas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El procedimiento de la invención permite obtener la posición de adsorción ξ_0 , el término de masa $\Delta m = \frac{1}{2} \frac{m_a}{m_c}$ y el término de rigidez $\Delta_s = \frac{1}{2} \frac{V_a E_a}{V_c E_c} \chi_s$ de una partícula depositada sobre la superficie de un NEMS a partir de la medida de los cambios en la frecuencia de resonancia en 3 o 4 modos flexurales de vibración, donde m es la masa, V es el volumen, E es el módulo de Young, χ_s es un número relacionado con la forma del adsorbato y de como el adsorbato se adhiere al resonador y los subíndices a y c se refieren al adsorbato y al resonador respectivamente. Por lo tanto, conociendo las propiedades del resonador se obtienen la masa m_a y la rigidez efectiva $V_a E_a \chi_s$. Este procedimiento permite calcular la masa de adsorbatos para los cuales la rigidez es importante con mayor precisión.

El espectrómetro de masas (MS) utilizado puede verse en la Figura 1. El MS está compuesto por tres cámaras con vacío diferencial. La primera cámara (1) se encuentra a presión atmosférica y conectada a la segunda por medio de un capilar caliente (8). La segunda cámara (2) se encuentra a 10 mbar y conectada a la tercera (3) por medio de un "skimmer" (o embudo en castellano) y un micro-orificio (100 μm) (4). La tercera cámara se encuentra a 0,1 mbar y contiene el resonador nano mecánico (5), que puede ser una palanca o puente. En la sección a presión atmosférica se encuentra un sistema de ionización mediante electro-spray encargado de enviar la muestra a los sensores. El ESI se compone de una botella (7) con la disolución y las partículas (inorgánicas, virales, etc.) de interés en suspensión y un capilar de polietere tercetona (PEEK) (6). La disolución es enviada al extremo del capilar incrementando la presión en la botella. Cuando la primera gota llega al extremo del capilar se aplica un alto voltaje (3-5 kV) generando el conocido cono de Taylor. Del pico del cono de Taylor eyecta un micro-chorro del cual salen pequeñas micro-gotas cargadas positivamente (si el alto voltaje es positivo, y negativas si el alto voltaje es negativo) las cuales contienen la disolución y las partículas de interés. Las micro-gotas generadas en la primera cámara (1) son enviadas a la segunda cámara (siguiente vacío diferencial) (2) donde se encuentra el capilar caliente (8). El diámetro interior del capilar caliente está entre 400 y 500 μm y su temperatura se fija entre 150 y 300°C lo cual favorece la evaporación de la disolución y evita que las partículas se peguen a las paredes mediante la agitación térmica. Las gotas cargadas positivamente van perdiendo parte de su masa pero no de su carga, lo cual produce que estas se dividan en gotas más pequeñas de forma progresiva. El momento de ruptura de una gota en gotas hijas se produce cuando se alcanza el límite de Rayleigh, que es cuando la tensión

superficial del líquido y la repulsión producida por las cargas positivas (o negativas en caso de que el alto voltaje sea negativo) están en equilibrio. Finalmente la disolución se evapora por completo quedando solo las partículas de interés. Las partículas entran en la tercera cámara (3), o tercer vacío diferencial, a través de un orificio de 100 μm de diámetro. En el tercer vacío diferencial se encuentra el resonador nano mecánico (5). En una puesta en práctica particular, el resonador es un puente o una palanca como la mostrada en la figura 2. La tercera cámara (3) dispone de dos ventanas ópticas que permiten medir las frecuencias naturales de oscilación del resonador por el método de deflexión del haz (figura 3). El láser (10) se enfoca en el resonador en el lugar donde el producto de las pendientes de los modos de vibración utilizados es máximo mediante micro-posicionadores XYZ y el haz reflejado es recogido por un foto-detector (9). La palanca es excitada por un elemento piezoeléctrico. Cuando una partícula llega a la superficie del resonador se produce un cambio en la frecuencia correspondiente a cada modo de vibración. A partir de los cambios relativos en frecuencia se encuentran, mediante cálculo numérico, los valores de f_0 , Δ_{m_1} y Δ_{m_2} que maximizan la función de densidad de probabilidad

$$JPDF(\vec{n}) = \frac{e^{-\frac{(\vec{n}-\mu)\Sigma^{-1}(\vec{n}-\mu)^T}{2}}}{(2\pi)^{N/2}\sqrt{|\Sigma|}}$$

El cambio en la frecuencia de vibración se puede medir de diversas maneras. En un ejemplo preferencial, un LASER es enfocado en el resonador en el lugar donde el producto de las pendientes de los modos de vibración utilizados es máximo. El haz reflejado es detectado por un fotodetector de 4 cuadrantes (o un fotodetector similar), lo que se conoce como la técnica de deflexión del haz. A continuación, la señal del fotodetector es pre-amplificada y enviada a un amplificador, preferentemente de tipo Lock-in (un tipo de amplificador que puede extraer señales de medios extremadamente ruidosos). Un material piezoeléctrico situado debajo del resonador es utilizado para realizar un barrido alrededor de las frecuencias de interés con el fin de obtener las frecuencias características y las fases del resonador. Las frecuencias y fases obtenidas en el punto anterior son utilizadas para configurar los lazos de seguimiento de fases (PLLs), que realizan el seguimiento en el tiempo de las frecuencias correspondientes. Cuando una partícula llega a la superficie del resonador se produce un cambio en las frecuencias de resonancia Δf_n . Este cambio es registrado mediante los PLLs. Los cambios en frecuencia se almacenan y a partir de los mismos se calculan los cambios en frecuencia relativos mediante la siguiente fórmula:

$$\mu_n = \frac{\Delta f_n}{f_{0n}} = \frac{f_n - f_{0n}}{f_{0n}}$$

Donde f_n es el promedio de la frecuencia en el tiempo correspondiente al modo n después de la adsorción y f_{0n} es el promedio de la frecuencia en el tiempo correspondiente al modo n antes de la adsorción. De esta forma se obtienen los cambios relativos de cada modo de vibración en función del tiempo y su desviación estándar.

5

Para obtener la posición de adsorción, la masa y la rigidez de la partícula adsorbida a partir de estos datos, que han sido almacenados, se deben realizar los siguientes pasos:

1. Se calcula a partir de los datos almacenados la desviación estándar del cambio relativo en frecuencia de cada modo σ_n y los valores del cambio relativo en frecuencia correspondiente a la adsorción μ_n .

10

2. Se forma la siguiente función de densidad de probabilidad a partir de los valores de μ_n y σ_n para los N modos utilizados (N=3 o N=4) que depende de las tres variables ξ_0 , Δ_m y Δ_s :

$$JPDF(\tilde{\Omega}) = \frac{e^{-\frac{(\tilde{\Omega}-M)\Sigma^{-1}(\tilde{\Omega}-M)^T}{2}}}{(2\pi)^{N/2}\sqrt{|\Sigma|}}$$

15 Donde $\tilde{\Omega} = (\Omega_1, \Omega_2, \dots, \Omega_N)$, con Ω_n dado por:

$$\Omega_n = -\Delta_m \psi_n(\xi_0)^2 + \Delta_s \frac{1}{\beta_n} \left(\frac{d^2 \psi_n(\xi_0)}{d\xi^2} \right)^2$$

Donde ψ_n y β_n son la forma de vibración y el autovalor del n-ésimo modo respectivamente, $M = (\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_N)$ y Σ es la matriz de covarianza que viene dada por:

$$\Sigma = \begin{pmatrix} \sigma_1^2 & \sigma_1 \sigma_2 \rho_{12} & \dots & \sigma_1 \sigma_N \rho_{1N} \\ \sigma_1 \sigma_2 \rho_{12} & \sigma_2^2 & \dots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \sigma_1 \sigma_N \rho_{1N} & \dots & \dots & \sigma_N^2 \end{pmatrix}$$

20 Donde ρ_{ij} es la correlación entre los modos i y j.

3. Se encuentran los valores de ξ_0 , Δ_m y Δ_s que maximizan la función de densidad de probabilidad $JPDF(\tilde{\Omega})$. En este punto un experto reconocerá que existen varios procedimientos para obtener los valores de ξ_0 , Δ_m y Δ_s que maximizan la función de densidad de probabilidad $JPDF(\tilde{\Omega})$. A continuación se proponen dos de ellos.

25

Primer ejemplo de realización:

Se forma el siguiente funcional:

$$F = (\tilde{\Omega}(\Delta_m, \Delta_s, \xi_0) - M)\Sigma^{-1}(\tilde{\Omega}(\Delta_m, \Delta_s, \xi_0) - M)^T$$

Se minimiza numéricamente el funcional F utilizando cualquier rutina de optimización existente, por ejemplo, el método de Newton.

5

Segundo ejemplo de realización:

Se forma el siguiente funcional:

$$G(\xi_0, \epsilon) = \sum_{n=1}^N \left(C_n(\xi_0, \epsilon) - \frac{\mu_n}{\sqrt{\sum_{m=1}^N \mu_m^2}} \right)^2$$

10 Donde $\epsilon = \frac{\Delta_s}{\Delta_m}$ y $C_n(\xi_0, \epsilon)$ viene dado por:

$$C_n = \frac{\Omega_n(\xi_0, \epsilon)}{\sqrt{\sum_{m=1}^N \Omega_m(\xi_0, \epsilon)^2}}$$

Donde $\Omega_n(\xi_0, \epsilon)$ viene dado por:

$$\Omega_n(\xi_0, \epsilon) = \Delta_m \left(-\psi_n(\xi_0)^2 + \epsilon \frac{1}{\beta_n^4} \left(\frac{d^2 \psi_n(\xi_0)}{d\xi^2} \right)^2 \right)$$

15 Se encuentran los valores de ξ_0 y ϵ que minimizan el funcional G utilizando cualquier rutina numérica existente (de nuevo, se puede utilizar el método de Newton).

Se forma el siguiente funcional:

$$F = (\tilde{\Omega}(\Delta_m, \epsilon, \xi_0) - M)\Sigma^{-1}(\tilde{\Omega}(\Delta_m, \epsilon, \xi_0) - M)^T$$

Se utilizan los valores previamente obtenidos de ξ_0 y ϵ y se sustituyen en el funcional F.

20 Se encuentra el valor de Δ_m que minimiza el funcional F. Por lo tanto ξ_0 , Δ_m y $\Delta_s = \epsilon \Delta_m$ quedan perfectamente determinados. Este procedimiento tiene ventajas computacionales con respecto al primero debido a que la función a minimizar es de dos variables en lugar de tres. A parte de estas ventajas computacionales este procedimiento es también más preciso que el primero.

25 Ejemplos:

30 Siguiendo el segundo procedimiento para nano-partículas de oro de 100nm de diámetro nominal se obtiene la figura 4. Se han medido 174 adsorciones de dichas nano-partículas sobre la superficie de una palanca. Se han almacenado cambios en frecuencia en los 3 primeros modos flexurales y se ha usado el segundo procedimiento descrito anteriormente para extraer la masa, posición y rigidez de las nano-partículas de oro. Con estos datos se

- ha construido una gráfica para la masa (figura 4) y otra para ϵ (figura 5). En la gráfica de masa se presenta también la distribución proporcionada por el fabricante (Sigma Aldrich, segmento con línea continua) y la distribución de masa obtenida sin tener en cuenta la rigidez (método descrito en el estado de la técnica) donde se aprecia claramente un desplazamiento en la distribución de masa hacia valores más pequeños cuando no se tiene cuenta la rigidez. En la gráfica se puede apreciar además que los datos que incluyen el efecto de rigidez encajan mejor con la distribución de masa proporcionada por el fabricante, de modo que el procedimiento de la invención presenta la ventaja adicional de mejorar las medidas del parámetro masa.
- 5
- 10 A partir de las definiciones dadas anteriormente para Δ_m y Δ_s se obtiene que el parámetro ϵ se puede expresar como:

$$\epsilon = \frac{\Delta_s}{\Delta_m} = \frac{\rho_c \chi_s E_a}{E_c \rho_a}$$

- 15 Donde ϵ es una medida directa y que es proporcional a la rigidez del adsorbato.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener la posición de adsorción, la masa y la rigidez de una partícula depositada sobre la superficie de un resonador a partir del cambio relativo en la frecuencia de resonancia de dicho resonador en 3 o 4 modos flexurales de vibración, donde dicho procedimiento comprende los siguientes pasos:

- a. se calcula la desviación estándar del cambio relativo en frecuencia de cada modo σ_n y los valores del cambio relativo en frecuencia correspondiente a la adsorción μ_n
- b. se forma la siguiente función de densidad de probabilidad

10

$$JPDF(\tilde{\Omega}) = \frac{e^{-\frac{(\tilde{\Omega}-M)\Sigma^{-1}(\tilde{\Omega}-M)^T}{2}}}{(2\pi)^{N/2}\sqrt{|\Sigma|}}$$

Donde $\tilde{\Omega} = (\Omega_1, \Omega_2, \dots, \Omega_N)$, con Ω_n dado por:

$$\Omega_n = -\Delta_m \psi_n(\xi_0)^2 + \Delta_s \frac{1}{\beta_n^4} \left(\frac{d^2 \psi_n(\xi_0)}{d\xi^2} \right)^2$$

Donde ψ_n y β_n son la forma de vibración y el autovalor del n-ésimo modo respectivamente,

15 $M = (\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_N)$, y Σ es la matriz de covarianza que viene dada por:

$$\Sigma = \begin{pmatrix} \sigma_1^2 & \sigma_1 \sigma_2 \rho_{12} & \dots & \sigma_1 \sigma_N \rho_{1N} \\ \sigma_1 \sigma_2 \rho_{12} & \sigma_2^2 & \dots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \sigma_1 \sigma_N \rho_{1N} & \dots & \dots & \sigma_N^2 \end{pmatrix}$$

Donde ρ_{ij} es la correlación entre los modos i y j;

- c. se calculan los valores de ξ_0 , Δ_m y Δ_s que maximizan la función de densidad de probabilidad.

20

2. Procedimiento según la reivindicación 1 donde el resonador es una palanca o un puente.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde, para maximizar la función de densidad de probabilidad $JPDF(\tilde{\Omega})$ se minimiza numéricamente el siguiente funcional:

25

$$F = (\tilde{\Omega}(\Delta_m, \epsilon, \xi_0) - M)\Sigma^{-1}(\tilde{\Omega}(\Delta_m, \epsilon, \xi_0) - M)^T$$

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde, para maximizar la

función de densidad de probabilidad $JPDF(\tilde{\Omega})$ se forma el siguiente funcional:

$$G(\xi_0, \epsilon) = \sum_{n=1}^N \left(C_n(\xi_0, \epsilon) - \frac{\mu_n}{\sqrt{\sum_{m=1}^N \mu_m^2}} \right)^2$$

Donde $\epsilon = \frac{\Delta_i}{\Delta_m}$ y $C_n(\xi_0, \epsilon)$ viene dado por:

$$C_n = \frac{\Omega_n(\xi_0, \epsilon)}{\sqrt{\sum_{m=1}^N \Omega_m(\xi_0, \epsilon)^2}},$$

5 donde $\Omega_n(\xi_0, \epsilon)$ viene dado por:

$$\Omega_n(\xi_0, \epsilon) = \Delta_m \left(-\psi_n(\xi_0)^2 + \epsilon \frac{1}{\beta_n} \left(\frac{d^2 \psi_n(\xi_0)}{d\xi^2} \right)^2 \right),$$

se encuentran los valores de ξ_0 y ϵ que minimizan el funcional G utilizando cualquier rutina numérica existente,

se forma el siguiente funcional:

10 $F = (\tilde{\Omega}(\Delta_m, \epsilon, \xi_0) - M)\Sigma^{-1}(\tilde{\Omega}(\Delta_m, \epsilon, \xi_0) - M)^T$

se utilizan los valores previamente obtenidos de ξ_0 y ϵ , se sustituyen en el funcional F ,

se encuentra el valor de Δ_m que minimiza el funcional F .

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las partículas son

15 partículas inorgánicas, virus, bacterias, proteínas o células.

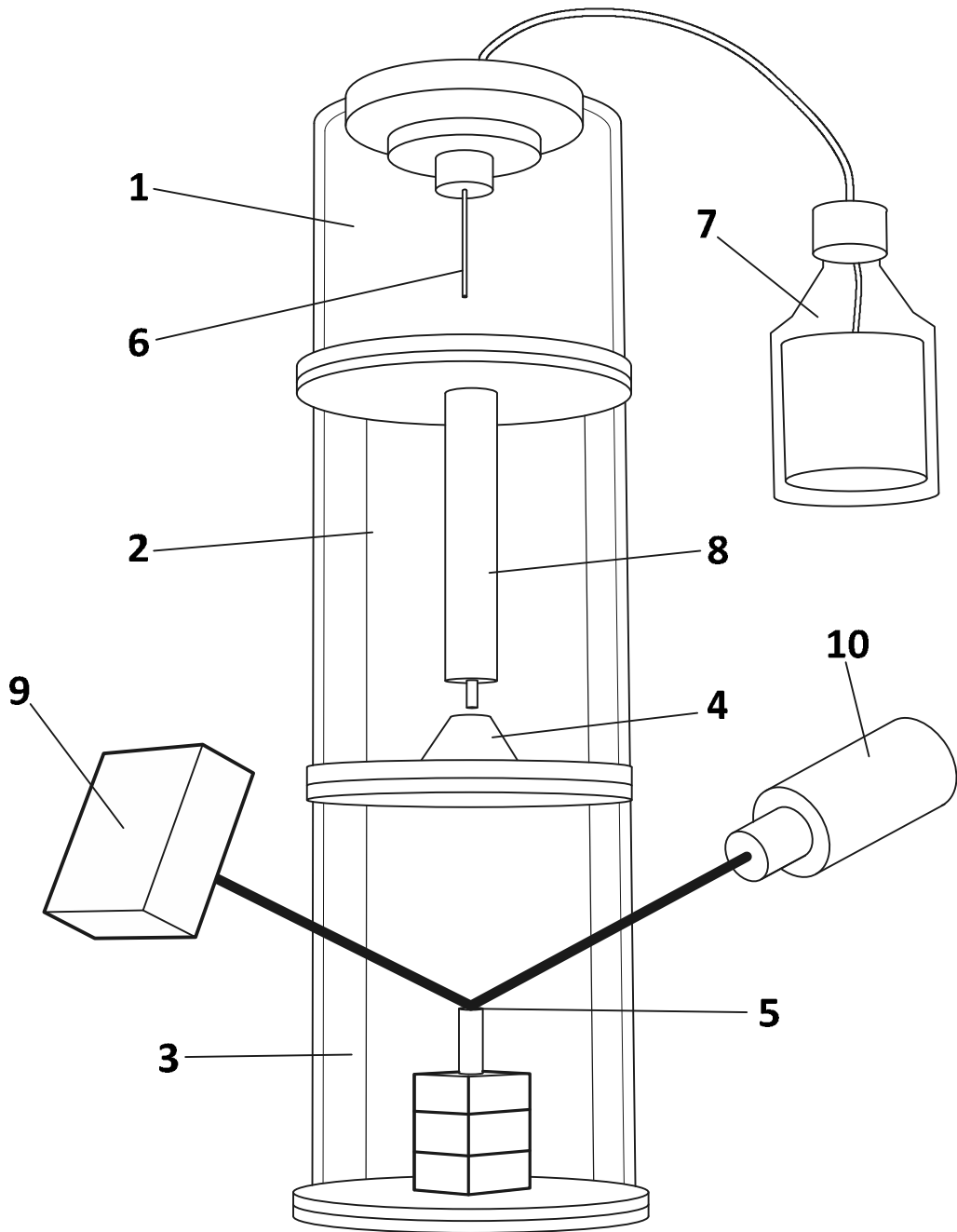


FIG. 1

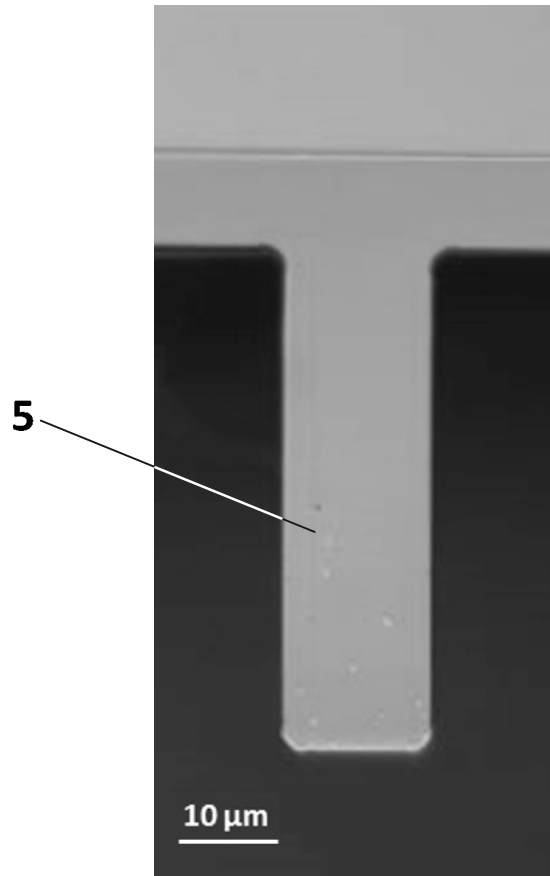


FIG. 2

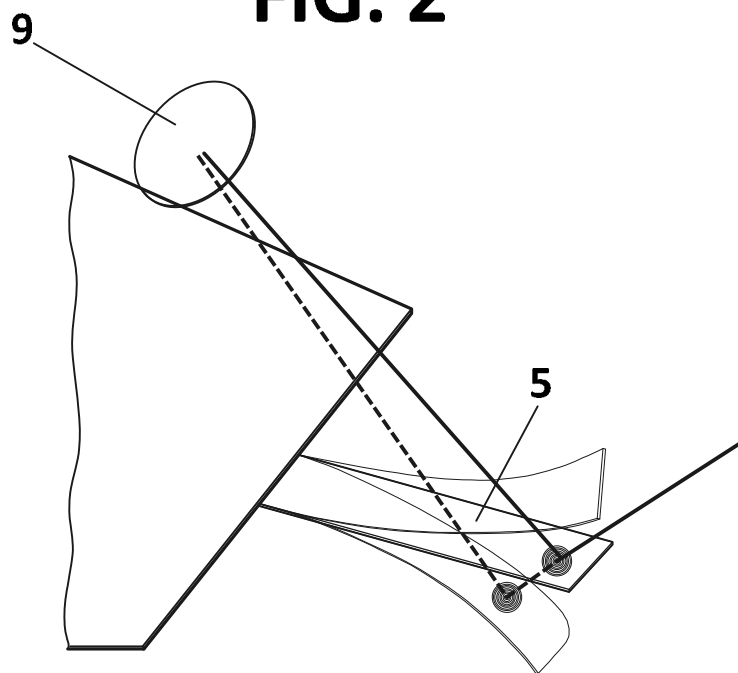
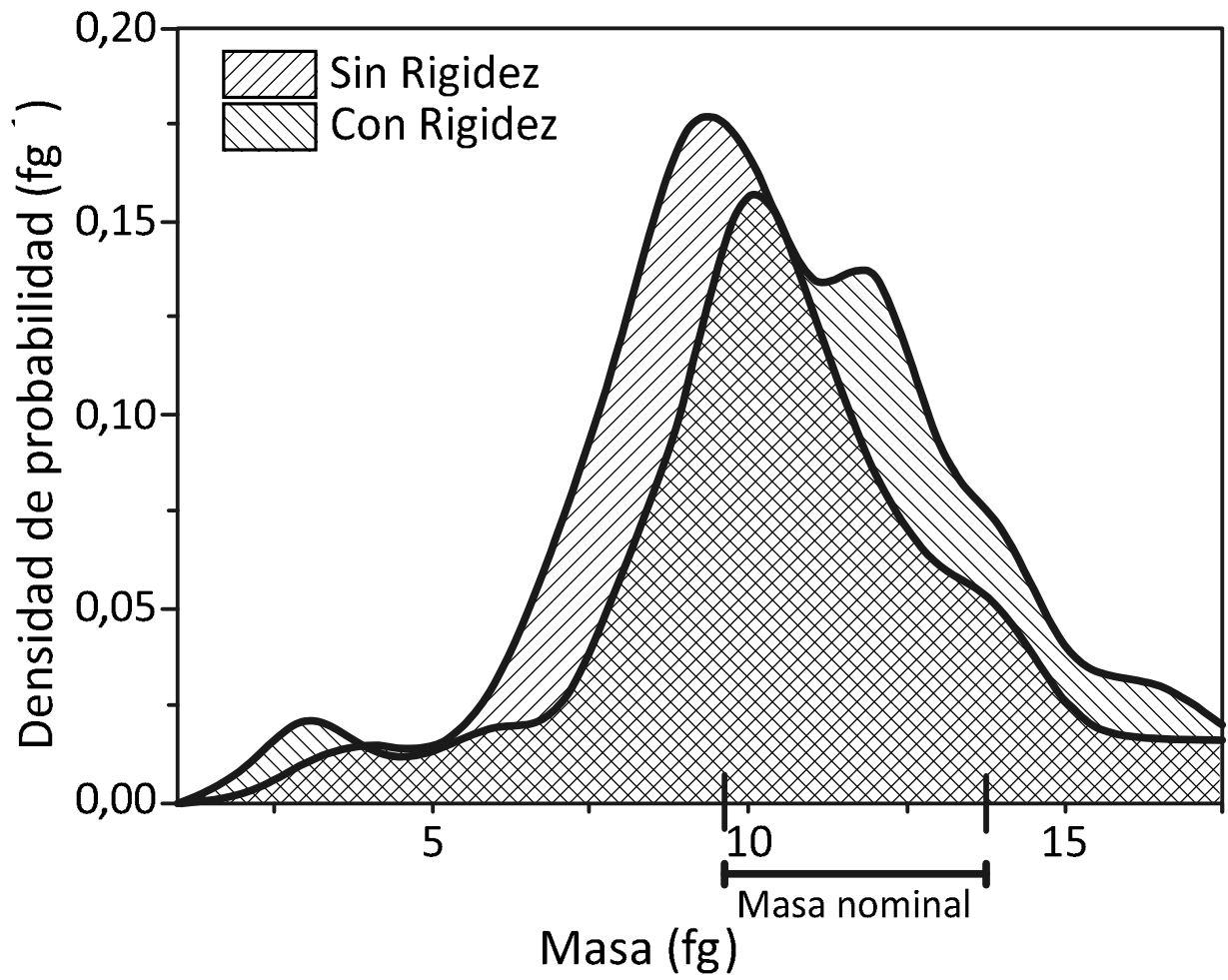


FIG. 3

**FIG. 4**

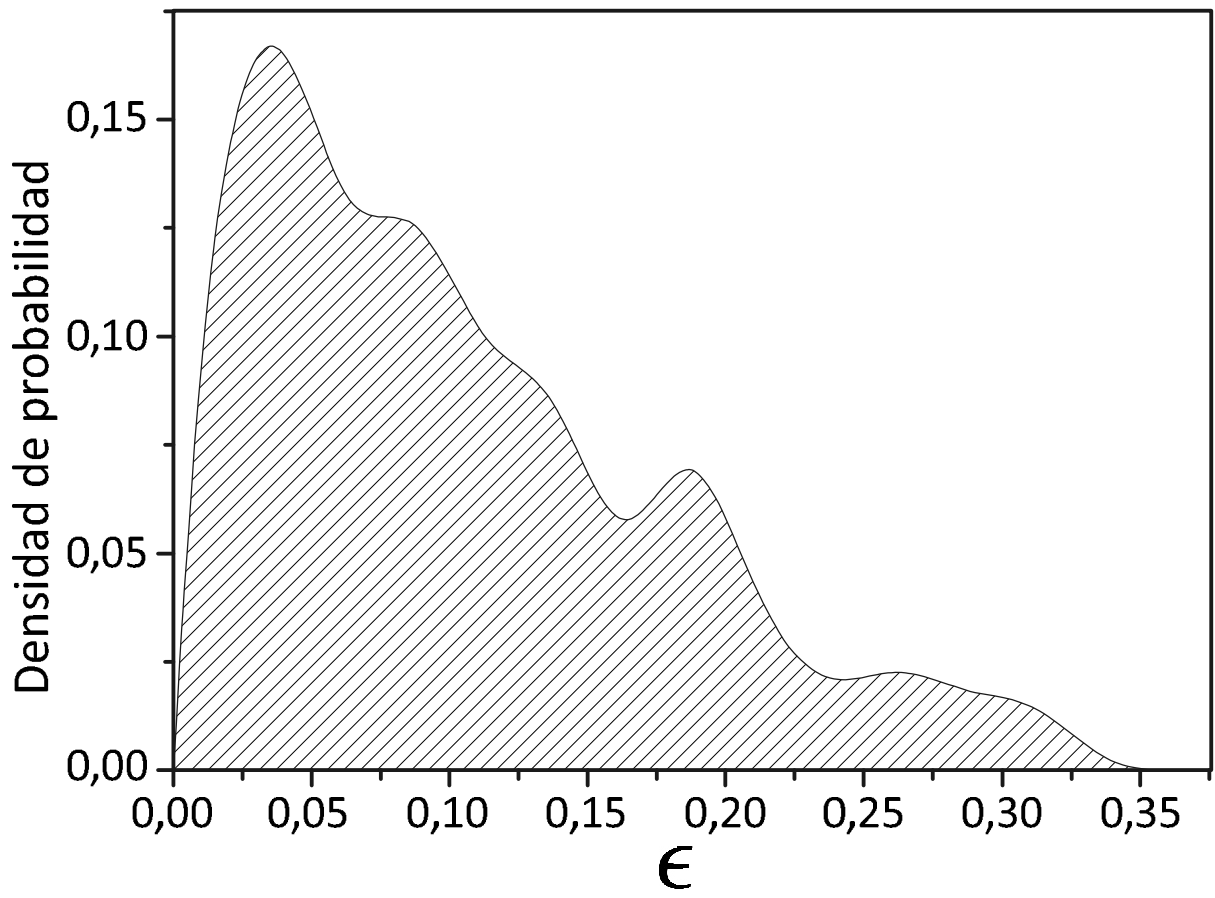


FIG. 5