

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 914**

51 Int. Cl.:

A61B 5/00 (2006.01)
G01N 29/02 (2006.01)
G01N 29/036 (2006.01)
G01N 29/04 (2006.01)
G01N 29/028 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2016 PCT/EP2016/063083**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16198483**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2016 E 16732958 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3302237**

54 Título: **Biosensor de TSM para caracterizar ex vivo las propiedades viscoelásticas de la piel**

30 Prioridad:

08.06.2015 EP 15020088
03.09.2015 EP 15306357

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2020

73 Titular/es:

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (20.0%)
3, rue Michel Ange
75016 Paris , FR;
UNIVERSITÉ DE CERGY-PONTOISE (20.0%);
CENTRE DE RECHERCHES BIOLOGIQUES ET D'EXPÉRIMENTATIONS CUTANÉES (20.0%);
INSTITUT FRANÇAIS DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DES TRANSPORTS, DE L'AMÉNAGEMENT ET DES RÉSEAUX (20.0%) y
CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET MÉTIERS (20.0%)

72 Inventor/es:

BESSE, RÉGIS;
LE HUEROU, JEAN-YVES;
SERFATY, STÉPHANE y
LATI, ELIAN

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 759 914 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

Biosensor de TSM para caracterizar *ex vivo* las propiedades viscoelásticas de la piel.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un biosensor de TSM para caracterizar *ex vivo* las propiedades viscoelásticas de la piel.

Estado de la técnica

10

La piel, que comprende la dermis, epidermis y el estrato córneo, es un material biológico complejo similar a capas a base de fibras, y en membranas de colágeno y elastina entremezcladas y sumergidas en un fluido, por sí mismo complejo, en una fase de gel (ácido hialurónico, fibroblastos, proteoglicanos, grasa y agua). La orientación de estas fibras y el espesor muy fino de estas capas implican que las propiedades viscoelásticas de la piel a menudo se observan como no lineales y anisotrópicas, y son difíciles de caracterizar o bien *in vivo* o bien *ex vivo*.

15

La prueba *ex vivo* más comúnmente utilizada de muestras de piel es la prueba de tracción. Utilizando este procedimiento, es difícil disponer de mediciones homogéneas y reproducibles particularmente debido a los efectos mecánicos no lineales implicados, la heterogeneidad y variabilidad de la piel.

20

El documento titulado "An Acoustic Wave Biosensor for Probing the Viscoelastic Properties of Living Cells" de Fang Li *et al.*, da a conocer un biosensor según el preámbulo según la reivindicación 1.

25

El documento US 2010/0075347 es un biosensor para detectar un analito.

30 Descripción de los dibujos de la invención

- La figura 1 describe el biosensor de TSM de la invención en una vista explosionada ordenada; los diferentes elementos del biosensor no están a escala.

35

- La figura 2 describe el biosensor de TSM de la invención en una vista en sección transversal.

40

- La figura 3 representa el modelo eléctrico modificado utilizado para caracterizar las propiedades viscoelásticas de la piel. A) Biosensor 1 de TSM utilizado para la caracterización de la piel *ex vivo* (piel cansada no tratada tras la monitorización del proceso de deshidratación): el biosensor 1 consiste en dos elementos: el transductor realizado en un resonador 3C de cuarzo de corte AT y un explante de piel *ex vivo* especialmente diseñado. B) El modelo eléctrico: dos ramas paralelas pueden representar independientemente tanto efectos eléctricos como mecánicos. La rama estática de impedancia Z_0 (en gris) incluye las propiedades eléctricas del cuarzo en función de la distribución de campo eléctrico entre los electrodos 4A, 4B; la rama dinámica (rama de movimiento) es representativa de las propiedades mecánicas del cuarzo Z_m^0 y la piel (Z_{carga}).

45

- La figura 4 representa el ajuste típico de la admitancia total del biosensor 1 de TSM correspondiente a la función de complejo eléctrico teórico de 3º orden correspondiente al circuito eléctrico.

50

- La figura 5 describe el explante 2 de piel con efecto de masa frente a BEM nutricional: La admitancia total X se compara para diferentes muestras. El efecto de masa se debe principalmente al líquido almacenado en la dermis 2A y epidermis 2B.

55

- La figura 6 es una comparación de la carga R para el donante de 36 años de edad: para la carga de BEM (izquierda) y carga de piel (derecha).

60

- La figura 7 describe la cinética de deshidratación a 37°C, higrometría del 22% para pieles tratadas de raza negra (puntos solo) y de raza blanca (estilo de línea): A) Variación relativa de la parte imaginaria de Z_{carga} ; B) donante de piel de raza blanca de 44 años de edad.

65

- La figura 8 describe el módulo de cizallamiento complejo $G = G' + j G''$, representativo de la viscoelasticidad de la piel a microescala, en función del tiempo, para el medio nutricional solo sin explante de piel (parte izquierda de la figura), y con el explante de piel (parte derecha de la figura) a 37°C; el explante de piel procede de un donante de piel de raza blanca de 44 años de edad y se muestra el efecto de deslipidación (línea de puntos) frente a piel convencional (línea continua).

Descripción general de la invención

La presente invención se refiere a un biosensor 1 de modo de cizallamiento de espesor (TSM) que comprende:

- 5 - un explante 2 de piel vivo *ex vivo*,
- un transductor 3 de TSM que comprende: un resonador 3C de cuarzo de corte AT que presenta dos superficies exteriores opuestas 3A,3B, y dos electrodos conductores 4A, 4B, estando cada electrodo conductor depositado sobre una de las dos superficies exteriores 3A, 3B.

10 La palabra 'vivo' significa que el explante 2 de piel vive cuando se realizan las mediciones y presenta un comportamiento biofísico comparable al comportamiento de la piel *in vivo*.

15 El explante de piel puede extraerse de una persona o un animal con cirugía plástica o puede reconstituirse con células biológicas en una matriz extracelular.

En la presente memoria los electrodos conductores son de metal, por ejemplo de oro.

20 En otras palabras, el resonador 3C de cuarzo de corte AT representa todos los sustratos piezoeléctricos de cristal de cuarzo existentes utilizados como generador de ondas de cizalla y como sensor de modo de cizallamiento de espesor.

Las ondas de cizalla generadas son ondas de volumen.

25 El modo de ondas generado es entonces el modo de cizallamiento de espesor (TSM).

El espesor del resonador 3C de cuarzo se selecciona para obtener una resonancia de frecuencia en el intervalo de RF y para generar ondas de cizalla de ultrasonidos.

30 Por ejemplo, la frecuencia fundamental del resonador 3C de cuarzo utilizado en la presente memoria es de 5 MHz.

Las dimensiones del resonador 3C de cuarzo pueden determinarse de modo que el resonador 3C de cuarzo puede presentar un factor de calidad Q mayor de 10^5 .

35 La forma de los electrodos 4A, 4B puede diseñarse con el fin de optimizar el modo de ondas de generación. En la presente memoria, en la figura 1, el resonador 3C de cuarzo es un disco piezoeléctrico con una superficie lateral. La forma de los electrodos colocados en ambas superficies del resonador 3C de cuarzo es asimismo un disco, y ventajosamente pueden presentar las mismas dimensiones y pueden cubrir toda la superficie del resonador 3C de cuarzo de corte AT.

40 Pero el resonador 3C de cuarzo y los electrodos 4A, 4B pueden presentar cualquier forma.

45 Los electrodos pueden ser por ejemplo espirales u otra forma, con el fin de controlarse mediante inducción, tal como se describe en la solicitud de patente WO2012/172253.

Ventajosamente, el explante 2 de piel cubre toda la superficie del electrodo sobre el que se deposita.

50 El transductor 3 de TSM permite medir y convertir parámetros eléctricos para determinar características mecánicas del explante 2 de piel vivo, y puede conectarse a un ordenador y un analizador en red.

El transductor 3 de TSM presenta:

- unos medios de medición 30,
- 55 - unos medios de monitorización y cálculo 31 que monitorizan una evolución en el tiempo de una respuesta eléctrica del explante de piel vivo, y que calculan, en el tiempo, a partir de la respuesta eléctrica, características microrreológicas del explante 2 de piel vivo.

60 El explante 2 de piel puede comprender por lo menos una de las capas de la piel entre: hipodermis, dermis 2A, epidermis 2B y el estrato córneo 2C.

Ventajosamente, el explante 2 de piel comprende un apilamiento de capas que comprende la dermis 2A, epidermis 2B y el estrato córneo 2C, estando la dermis 2A en contacto con el transductor 3 de TSM, estando el estrato córneo 2C en contacto con el aire.

65 Las capas pueden comprender un producto o pueden pretratarse antes de medir la respuesta eléctrica del explante

2 de piel, la función de ondas de cizalla del TSM.

Ventajosamente, no es necesario que la dermis 2A esté pegada o adherida sobre el transductor 3 de TSM, y se adhiere de manera natural apropiadamente al transductor 3 de TSM. Por tanto, tanto el explante 2 de piel como el transductor 3 de TSM pueden considerarse como un único dispositivo denominado biosensor 1 de TSM. La invención permite conseguir una piel instrumentada.

Este es particularmente el caso cuando los electrodos 4A, 4B son de oro y cuando la dermis 2A se dispone sobre el electrodo justo después de la preparación y el depósito del electrodo sobre el resonador de sustrato.

Una superficie inferior del explante 2 de piel está en contacto con el transductor 3 de TSM, estando una superficie superior del explante 2 de piel en contacto con el aire, considerarse un eje vertical perpendicular al TSM y el explante de piel que se mantienen juntos horizontalmente.

Cuando el explante 2 de piel comprende la dermis 2A, la epidermis 2B y el estrato córneo 2C, una superficie inferior de la dermis 2A está en contacto con el transductor 3 de TSM, estando una superficie superior del estrato córneo 2C en contacto con el aire.

El explante 2 de piel, en particular el estrato córneo 2C, puede tratarse mediante un producto que se somete a prueba.

El biosensor 1 se modela mediante el circuito de Butterworth-van-Dyke (BVD) de elementos concentrados eléctricos equivalentes modificados que comprende:

- una rama estática que modela el comportamiento eléctrico del resonador 3C de cuarzo, y
- una rama dinámica paralela a la rama estática y que modela el comportamiento mecánico del resonador 3C de cuarzo y el comportamiento mecánico del explante de piel vivo.

La rama estática comprende una resistencia y un condensador conectados en paralelo.

La rama dinámica comprende en serie:

- un condensador, una autoinductancia y una resistencia que modelan el comportamiento mecánico del resonador 3C de cuarzo, y
- una impedancia eléctrica equivalente adicional indicada $Z_{carga} = R + j X$. Esta impedancia está vinculada con el módulo de cizallamiento complejo $G = G' + j G''$, representativo de la viscoelasticidad del explante de piel (2) vivo a microescala, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$R = \frac{h^2}{4Ae_q^2} \sqrt{\rho_{piel} \left(\frac{|G(\omega)| + G'(\omega)}{2} \right)}$$

$$X = \frac{h^2}{4Ae_q^2} \left(\sqrt{\rho_{piel} \left(\frac{|G(\omega)| - G'(\omega)}{2} \right)} + \omega h_{eff} \right)$$

donde h es el espesor del transductor de TSM (excluyendo el espesor del explante), A la superficie de los electrodos de metal, e_q la constante piezoeléctrica, ρ_{piel} es la densidad de la piel, ω es la pulsación de resonancia, G' , G'' son respectivamente el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida correspondientes a las partes real e imaginaria del módulo de cizallamiento complejo G, y h_{eff} es la profundidad de la piel viva.

Z_{carga} es la respuesta eléctrica del explante 2 de piel vivo y se mide y monitoriza mediante los medios 30 y 31.

El módulo de cizallamiento complejo G caracteriza el comportamiento microrreológico del explante 2 de piel vivo.

La figura 8 representa la capacidad del biosensor 1 para medir la viscoelasticidad de la piel (comparación entre experimentos con medio nutricional solo (parte izquierda de la figura) y con el explante de piel vivo (parte derecha de la figura) y para observar el efecto de los pretratamientos de la piel.

Realmente, el módulo de pérdida G'' es idéntico en presencia de medio nutricional ya esté el explante de piel vivo

deslucidado o no deslucidado, mientras que el módulo de almacenamiento G' que es representativo de la elasticidad de la piel es claramente mayor para la piel convencional que para la piel deficiente en lípidos (parte derecha de la figura).

5 En una primera forma de realización, el transductor 3 de TSM comprende un medio 5 de cultivo en contacto con por lo menos una de las superficies de uno de los dos electrodos 4A, 4B y sobre la que la hipodermis o dermis 2A del explante 2 de piel está en contacto con su superficie inferior, con el fin de garantizar la supervivencia del explante 2 de piel sobre el transductor 3 de TSM por lo menos varias horas.

10 De hecho, la supervivencia del explante 2 de piel puede garantizarse varios días (más de 10 días, por ejemplo 16 días), dependiendo del contacto entre el medio 5 de cultivo y el explante 2 de piel, las condiciones exteriores (temperatura...) y la naturaleza del medio 5 de cultivo.

15 El medio 5 de cultivo es un líquido, un gel, un aerogel, una crema y/o una capa funcionalizada.

En una primera variante de la primera forma de realización, el medio 5 de cultivo es un gel, un aerogel o una crema depositada sobre la superficie de uno de los dos electrodos conductores 4A, 4B.

20 En una segunda variante de la primera forma de realización, el medio 5 de cultivo es una capa funcionalizada dispuesta sobre uno de los dos electrodos conductores 4A, 4B, y sobre la que la superficie inferior del explante 2 de piel está en contacto, con el fin de garantizar la supervivencia del explante 2 de piel sobre el transductor 3 de TSM por lo menos varias horas.

25 En una tercera variante de la primera forma de realización, el transductor de TSM presenta por lo menos una abertura que se llena con medio 5 de cultivo, permitiendo la supervivencia del explante 2 de piel durante por lo menos varias horas o por lo menos varios días.

30 Es posible realizar muchas aberturas en el electrodo y en el cuarzo del transductor de TSM y para formar como una rejilla, conteniendo cada abertura algo de medio 5 de cultivo.

35 En una segunda forma de realización, el explante 2 de piel se mueve y se retira entre el transductor 3 de TSM y un receptáculo en el que hay medio 5 de cultivo. En esta segunda forma de realización, el explante 2 de piel permanece sobre el transductor de TSM solo para la medición por ejemplo 15 minutos y entonces se reintegra en el receptáculo para alimentar el explante 2 de piel y para mantenerlo vivo.

40 En una tercera forma de realización, la invención asimismo se refiere, tal como se dibuja en la figura 2, a un dispositivo que comprende un biosensor 1 de TSM tal como se definió anteriormente, y un receptáculo en el que se deposita el biosensor 1 de TSM, estando el biosensor 1 de TSM rodeado por medio 5 de cultivo, estando el transductor 3 de TSM sumergido en el medio 5 de cultivo para mantener la superficie inferior de la dermis 2A en el medio 5 de cultivo y la superficie superior del estrato córneo 2C en contacto con el aire, permitiendo la supervivencia del explante 2 de piel durante por lo menos varias horas o por lo menos varios días.

45 Por tanto, el biosensor 1 de TSM y el receptáculo pueden comercializarse juntos, siendo capaz el explante 2 de piel de sobrevivir por lo menos varios días.

La invención asimismo se refiere a un procedimiento para determinar las características mecánicas de un explante 2 de piel vivo *ex vivo*, comprendiendo el explante 2 de piel vivo por lo menos una capa entre: hipodermis, dermis 2A, epidermis 2B y el estrato córneo 2C.

50 El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (a) extraer un explante 2 de piel vivo de un medio 5 de cultivo,
- 55 - (b) depositar el explante 2 de piel vivo sobre el transductor 3 de TSM, depositándose una superficie inferior del explante 2 de piel sobre el transductor 3 de TSM, estando una superficie superior del explante 2 de piel en contacto con el aire,
- (c) medir y monitorizar los parámetros eléctricos para determinar y calcular las características mecánicas del explante 2 de piel vivo.

60 Por ejemplo, la hipodermis o dermis 2A se deposita sobre el transductor 3 de TSM, estando el estrato córneo 2C en contacto con el aire.

65 En una etapa (d) después de la etapa (c), el explante 2 de piel vivo se extrae del transductor 3 de TSM y se deposita en el medio 5 de cultivo.

En una etapa (e) después de la etapa (d), las etapas (a), (b), (c), (d) se realizan de nuevo.

En particular, las etapas (a), (b), (c), (d) se realizan varias veces durante varios días.

5 El explante 2 de piel vivo se pretrata, por ejemplo se hidrata o se deslipida.

El explante 2 de piel vivo se trata con por lo menos un producto, antes de o después de su deposición, sobre el transductor de modo de cizallamiento de espesor (TSM), para monitorizar los efectos de los productos sobre la piel.

10 En la etapa (b), en una primera forma de realización, el explante 2 de piel vivo se dispone en contacto con uno de los dos electrodos conductores 4A, 4B.

15 En la etapa (b) en una primera variante de la primera forma de realización, el explante 2 de piel vivo se deposita sobre un gel que comprende medio 5 de cultivo, depositándose el gel sobre uno de los dos electrodos conductores 4A, 4B.

20 En la etapa (b) en una segunda variante de la primera forma de realización, el explante 2 de piel vivo se deposita sobre una capa funcionalizada con medio 5 de cultivo, depositándose la capa funcionalizada sobre uno de los dos electrodos conductores 4A, 4B.

La invención asimismo se refiere a la utilización del biosensor 1 de TSM para monitorizar el comportamiento mecánico *ex vivo* del explante 2 de piel vivo y por tanto para seguir su evolución estructural en función del tiempo, midiendo sus características viscoelásticas.

25 En particular, se refiere a una utilización para detectar y/o seguir enfermedades de la piel.

En particular, se refiere a una utilización para analizar y/o estudiar el efecto de un producto aplicado al explante 2 de piel o tratamiento específico.

30 **Ejemplo de una nueva técnica de investigación de la piel en línea para rastrear los efectos mecánicos de productos sobre la piel que se refiere a piel deslipidada y piel hidratada con una aplicación a base de crema de tratamiento especial.**

35 Para este estudio, se utilizan explantes 2 de piel abdominal *ex vivo* de cirugía plástica y mantenidos vivos. Considerando la piel como un fluido complejo compuesto por estructuras fibrosas y membranosas sumergidas en líquido, su respuesta mecánica a una excitación con ondas de cizalla de espesor (es decir, análisis de tensión-deformación) implica tanto una componente viscosa asociada con la disipación de la energía como una componente elástica asociada con el almacenamiento de energía. Una monitorización estrecha de estas dos componentes a partir de la respuesta de un sensor de TSM (basado en un resonador 3C de cuarzo de corte AT a 5 MHz) en contacto con la dermis 2A del explante *ex vivo* da acceso a la evolución de los módulos de cizalla dinámicos complejos (G' y G'') de la piel; el modelo mecánico apropiado que describe la respuesta del sensor frente a las interacciones de ondas de cizalla/matriz permite investigar el impacto del producto (o tratamiento) sobre las propiedades viscoelásticas de la piel.

45 El estudio complejo de la respuesta de TSM en el dominio temporal permite un control a) de la evolución de la deshidratación a 37°C debida a la matriz de membranas lipídicas intercelulares interpenetradas que incluye la primera etapa del proceso de permeación desde la dermis 2A hasta el estrato córneo 2C (SC); b) el impacto sobre la cinética del proceso de permeación por un producto aplicado a la superficie del SC. Esta información incluye la evolución de la estructura y las propiedades del colágeno y las fibras elásticas y los proteoglucanos ubicados en la piel. Una comparación de los resultados mecánicos con otras técnicas en la bibliografía confirma la validez del modelo. Estos resultados preliminares muestran que la presente técnica de TSM puede ser un nuevo modo apreciable para la investigación de la piel *ex vivo skin* para someter a prueba y optimizar nuevos productos cosméticos.

55 La piel es un material de cuatro capas biológicas complejas principales (epidermis 2B, dermis 2A, hipodermis o estrato córneo 2C) basadas principalmente en fibras de colágeno y elastina interconectadas integradas en una mezcla de tipo gel de fluidos (ácido hialurónico, fibroblastos, proteoglucanos, grasa y agua) [1]-[3]. Desde un punto de vista mecánico, la piel puede considerarse un fluido complejo viscoelástico basado en membranas y fibras sumergidas en un líquido [4], [5]. En estas condiciones, sus propiedades pueden caracterizarse como elastómeros o material complejo híbrido anisotrópico y no lineal [6]-[11]. Por un lado, la viscoelasticidad de la piel puede atribuirse principalmente a la interacción entre las fibras de elastina - colágeno interpenetradas y la mezcla líquida. Por otro lado, el comportamiento de anisotropía es el resultado de la orientación preferente de los haces de colágeno y la tensión de la piel *in vivo* [12]-[14]. Se utilizan diferentes pruebas no invasivas para caracterizar y detectar macroscópicamente enfermedades de la piel [15]. Utilizando tensión de movimiento sobre una muestra *ex vivo*, la medición de la viscoelasticidad lineal puede lograrse más fácilmente. La prueba más comúnmente

utilizada para muestras de piel *ex vivo* es la prueba de tracción. Utilizando este procedimiento, se han señalado sobre todo los efectos no lineales y el comportamiento viscoelástico de la piel animal [16]-[19]. Existen muchas otras dificultades para realizar mediciones homogéneas debido a la heterogeneidad de la estructura de la piel y la gran variabilidad entre las muestras. Hasta la fecha, se describen en gran medida en la bibliografía otros procedimientos experimentales basados en la medición de la tensión-deformación. Algunos de ellos se basan en mediciones de torsión y deformación generadas por la propagación de ondas de ultrasonidos. Una revisión reciente describe los resultados relevantes disponibles en la bibliografía [20]. Pueden dar acceso a la viscoelasticidad lineal de la piel a diferente escala dependiendo de la longitud de onda.

Se utiliza una técnica reológica de alta frecuencia añadida a un modelo adecuado para monitorizar el módulo de cizallamiento complejo G (relacionado con la viscoelasticidad) de la piel. La técnica utiliza un biosensor 1 compuesto por un resonador de modo de cizallamiento de espesor (TSM) (como transductor) en contacto con la dermis 2A de la piel. Tanto el transductor como el material se consideran entonces un biosensor 1 de TSM con pérdida equivalente. Utilizando un enfoque original basado en análisis de Wheeler para microtira con pérdida, este modelo da acceso a la evolución mecánica de la piel considerada como un fluido complejo heterogéneo [21], [22].

Con el fin de determinar el impacto de la deshidratación de la piel sobre las interacciones de ondas de cizalla ultrasónicas, se estudian las respuestas del resonador de TSM cargado mediante diferentes pieles y tratamientos.

La configuración experimental de TSM para la monitorización de la piel *ex-vivo*

Muestras *ex vivo*

Se prepararon muestras de piel humana *ex vivo* de 5 mm de espesor a partir de biopsias abdominales (cirugías plásticas sanas) de dos donantes masculinos de respectivamente 36 años de edad con piel de raza negra y 44 años de edad con piel de raza blanca. Con el fin de estudiar las 3 primeras capas (desde el estrato córneo 2C (SC) hasta la capa de la dermis 2A), se elimina la grasa subcutánea de la piel.

Se cortan explantes circulares de 10 mm de diámetro con el fin de integrar cada muestra con un sustrato piezoeléctrico de cristal de cuarzo (descrito en la siguiente sección) utilizado como generador de ondas de cizalla y sensor de modo de cizallamiento de espesor. Se mantuvieron los explantes 2 de piel humana en supervivencia sobre rejillas, en placas que contiene 2 ml de medio BIO-EC especial (BEM: medio del laboratorio BIO-EC, Francia). BEM mantiene los explantes en supervivencia durante varios días, aproximadamente 20 días [24].

Preparación de explantes circulares: A) corte circular para el biosensor integrado, B) la piel humana se mantiene en supervivencia preparada para el tratamiento.

Las muestras de cada donante se preparan con el fin de estudiar la sensibilidad del nuevo biosensor 1 frente al tratamiento de hidratación de la piel. Se estudian entonces 3 tipos de piel tratada: A) piel sin tratar utilizada como referencia; B) piel deslipidada; C) piel hidratada con una aplicación a base de crema de tratamiento especial. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Los productos y tratamientos sometidos a prueba se aplicaron sobre los explantes en cuanto se prepararon. Se incubaron los explantes 2 de piel tratados y sin tratar a 37°C en condiciones de atmósfera normal. Para monitorizar el proceso de deshidratación, se deposita una película protectora en la superficie de la piel. Esta película garantiza una hidratación convencional de la piel. Siempre que la película esté presente, las condiciones de hidratación permanecen sin cambios.

Biosensor 1 de TSM para la caracterización de la piel

El biosensor 1 de TSM consiste en un disco fino de cuarzo de corte AT con electrodos de metal 4A, 4B depositados en ambos lados (el resonador) en contacto en un lado con la dermis 2A de la muestra de piel humana *ex vivo*. Los diámetros del cristal y el electrodo son respectivamente de 14 mm y 5 mm. El espesor del cuarzo de 270 μm proporciona una frecuencia de resonancia de aproximadamente 5 MHz. Considerando las propiedades piezoeléctricas del disco de cuarzo, su orientación de cristal, la forma de los electrodos 4A, 4B y el campo eléctrico aplicado entre los electrodos 4A, 4B, puede inducirse una deformación específica de la superficie del cristal. El corte AT de 35°10' implica desplazamientos de cizalla máximos en las superficies [25].

Modelos electromecánicos describen ya el proceso de oscilaciones completo del resonador. Se derivan de las ecuaciones constitutivas piezoeléctricas. Mason ha sugerido un modelo de banda ancha acústico de una dimensión general [26]. En casos particulares, tales como baja carga, el modelo de Mason puede simplificarse fácilmente cerca de las frecuencias resonantes a un circuito de Butterworth-van-Dyke (BVD) de elementos concentrados eléctricos equivalentes [27].

Cuando el sensor se carga mediante una capa rígida o un líquido, la masa de la capa en contacto implica un desplazamiento de frecuencia [28], [29]. Además, las condiciones límite mecánicas incluyendo la carga de la piel

se modifican por las propiedades reológicas de skin. Estas condiciones inducen un desplazamiento de frecuencia adicional y una amortiguación de la resonancia correspondiente a la atenuación y un retardo de las ondas de cizalla ultrasónicas propagadas [30]-[32].

- 5 $Z_{carga} = R + j X$ es representativa de estos cambios. La variación de la respuesta eléctrica puede entonces obtener de manera precisa G , utilizando la siguiente expresión [33]-[35].

$$R \cong K \rho_{piel} \sqrt{\frac{(|G(\omega)| + G'(\omega))}{2 \rho_{piel}}}$$

$$X \cong K \rho_{piel} \left(\sqrt{\frac{(|G(\omega)| - G'(\omega))}{2 \rho_{piel}}} + \omega h_{eff} \right) \quad (1)$$

10

donde K es el factor de acoplamiento electromecánico, ρ_{piel} es la densidad de la piel (1.1 g/cm^3), ω es la angular frecuencia de resonancia y G' , G'' son respectivamente el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida correspondientes a las partes real e imaginaria del módulo de cizallamiento complejo G y h_{eff} es la profundidad de la piel viva. Obsérvese que el efecto de masa (a la frecuencia de resonancia) depende solo del producto densidad de la piel - espesor eficaz de penetración de las ondas.

15

Configuración experimental

20

La configuración experimental consiste en un análisis de impedancia del biosensor 1 durante la deshidratación de la piel. Con el fin de estudiar el efecto de tratamientos, se monitoriza cada muestra a temperatura controlada (37°C) utilizando un horno de laboratorio. Considerando el alto factor Q del resonador de TSM, se prefiere la medición de admitancia. Se analiza entonces una amplitud de 7 kHz alrededor de la frecuencia de resonancia para medir la respuesta de admitancia total $Y_e(\omega)$ del biosensor 1 cargado utilizando el analizador en red HP4195A. Se miden entonces regularmente 400 puntos espectrales en menos de 50 segundos. Se realiza un ajuste en línea de esta respuesta en el plano complejo para obtener la parte real e imaginaria de Z_{carga} . Entonces pueden obtenerse las características viscoelásticas de la piel.

25

30

Con el fin de observar la evolución temporal, se muestrea entonces la respuesta de frecuencia de la admitancia cada minuto.

MONITORIZACIÓN DE LA DESHIDRATACIÓN DE LA PIEL UTILIZANDO PRUEBAS DE MICRORREOLOGÍA

35

Con el fin de estudiar la sensibilidad del biosensor 1 y validar la prueba de concepto de una nueva técnica para monitorizar la hidratación de explantes 2 de piel *ex vivo* 2, se exploran 3 tipos de tratamiento: piel sin tratar, piel hidratada y piel deslipidada.

Efecto de masa y sensibilidad de estructuras rígidas

40

Para monitorizar de manera precisa la variación de R y X debido a los efectos viscoelásticos durante la deshidratación, se estudia en primer lugar el efecto de masa debido al líquido integrado en la epidermis 2B y dermis 2A. En primer lugar, se caracterizan los transductores (sin explantes 2 de piel) para obtener los elementos de los elementos de movimiento sin carga. Esta medición da acceso a parámetros característicos de transductores no perturbados. Se realiza una medición de estos transductores cargados mediante líquido nutricional BEM. Considerando que este líquido es un líquido newtoniano ($G' \approx 0$), el efecto de masa puede obtenerse directamente a partir de las dos primeras mediciones (variación de admitancia de transductor no perturbado y transductor cargado con líquido BEM). Suponiendo la ecuación 1, la parte real de Z_{carga} permite la obtención de la viscosidad a partir del módulo viscoso G'' . Como consecuencia, la siguiente resta proporciona el efecto de masa (X_m):

45

$$X_m = \text{Im}[Z_L] - \text{Re}[Z_L] = K \rho_{piel} \omega h_{eff}$$

50

Comparando la parte real e imaginaria de Z_{carga} para cada medición, puede estimarse el efecto de masa típico a $X_m=10\Omega$. Este primer resultado muestra que la reactancia total se debe principalmente a la variación viscoelástica ($X_m/X < 1\%$). La figura 5 representa la variabilidad de la reactancia total y el efecto de las fibras de la piel en comparación con BEM.

55

En las condiciones iniciales, la reactancia total X para la carga de la piel es similar a la carga de BEM. De acuerdo con la bibliografía de tribología de la piel, la piel puede considerarse como un fluido complejo viscoso que presenta una viscosidad principalmente debida a la característica líquida. La densidad de la piel puede considerarse próxima a la densidad de un líquido. Este resultado concuerda con el hecho de que a la dermis 2A se le suministra de manera continua mezcla acuosa por medio del torrente sanguíneo. En la dermis 2A, una parte de la mezcla líquida está presente en fase de gel, unida a muchas macromoléculas hidrófilas. A pesar de la gran capacidad de estas moléculas para capturar mezcla acuosa, una parte de la misma permanece móvil y difunde a las capas superiores de la piel. Debe apreciarse que la reactancia del transductor cargado mediante la piel es ligeramente inferior en proporción a la superficie en contacto con la carga.

En cambio, mientras que la parte imaginaria permanece constante, la parte real de la carga de impedancia R aumenta significativamente tal como se muestra en la figura 6.

Considerando la ecuación 1, esta variación se debe a las interacciones de las macromoléculas que forman una ultraestructura rígida basada en fibras de elastina y colágeno sumergidas en grasa y líquido. La variación de R da acceso a la elasticidad de la piel durante la deshidratación. Puede observarse asimismo que permite una mejor interpenetración de las capas aumentando la rigidez tal como se muestra en la figura 1.

Monitorización de la cinética de deshidratación

Las membranas lipídicas del SC intercelulares desempeñan un papel crucial en la regulación de la pérdida de líquido intrínseco de la piel. Este proceso, de hecho, está directamente correlacionado con la permeabilidad de las membranas del SC a este líquido acuoso. La monitorización del SC utilizando espectroscopía de dispersión de rayos X y RMN estudia generalmente este proceso [36]-[38]. Con el fin de estudiar preliminarmente la capacidad de la presente técnica para monitorizar el proceso de deshidratación, se someten a prueba diferentes tratamientos de piel humana *ex vivo*. La figura 7 muestra la variación típica de X para piel tratada y sin tratar a partir de los dos donantes.

El tiempo inicial ($t=0$) es el momento desde el que se retira la película protectora. Como forma general, se observa una disminución exponencial ya conocida debida a la difusividad del vapor de líquido en la membrana lipídica. De acuerdo con el modelo de difusión unidimensional, este resultado se observa asimismo mediante una medición indirecta de la humedad relativa en la cámara de QCM en función del tiempo [39]. La figura 7A) muestra la repetibilidad de esta técnica (piel sin tratar). El tiempo característico cinético se modifica claramente en función del tratamiento de la piel. La cinética larga de la deslipidación de la piel muestra el papel de los lípidos en la deshidratación. Además, la parte real de Z_{carga} (figura 7B) para este tratamiento muestra el endurecimiento de la piel debido a las interacciones de macromoléculas. Comparando el efecto de diferentes tratamientos, la presente técnica puede detectar su modificación estructural y su eficiencia. Un estudio sistemático debe permitir la optimización de un producto cosmético y evidencias de eficacia.

El biosensor 1 de TSM permite una monitorización de piel humana *ex vivo* para pruebas de tratamiento con un intervalo dinámico grande. Los primeros resultados muestran que es posible seguir completamente la evolución de los parámetros viscoelásticos para la monitorización de la deshidratación o monitorización de la estructura de la piel desde el estrato córneo 2C hasta la dermis 2A. A partir de la evolución temporal de la parte real e imaginaria de la carga de impedancia, puede detectarse el efecto del tratamiento de la piel sobre la estructura de capas de la piel y las propiedades mecánicas. Este estudio preliminar muestra que esta técnica puede ser adecuada para acceder a los módulos G' elástico y G'' viscoso mediante la microrreología. Este nuevo biosensor 1 junto con el presente modelo deben convertirse en una técnica *ex vivo* sensible para pruebas objetivas de la piel y de eficiencia de productos cosméticos.

Bibliografía

[1] R. F. Rushmer, K. J. K. Buettner, J. M. Short, y G. F. Odland, "The Skin", Science (80-), vol. 154, n.º 3747, págs. 343-348, 1966.

[2] G. Odland, "Structure of the skin", en Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin, 1991, págs. 3-62.

[3] C.W. Oomens, D. H. van Campen, y H. J. Grootenboer, "A mixture approach to the mechanics of skin.", J. Biomech., vol. 20, n.º 9, págs. 877-885, 1987.

[4] F. Xu y T. Lu, "Introduction of Skin Biothermomechanics", en Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain, 2011, págs. 209-220.

[5] F. Xu, T. J. Lu, y K. A. Seffen, "Biothermomechanical behavior of skin tissue", Acta Mech. Sin. Xuebao, vol. 24, n.º 1, págs. 1-23, 2008

- [6] F. Xu y T. J. Lu, "Chapter 3 Skin Biothermomechanics: Modeling and Experimental Characterization", en *Advances in Applied Mechanics*, volumen 43, 2009, págs. 147-248.
- 5 [7] F. Xu, T. J. Lu, y K. A. Seffen, "Biothermomechanics of skin tissues", *J. Mech. Phys. Solids*, vol. 56, n.º 5, págs. 1852-1884, 2008.
- [8] A. Delalleau, G. Josse, J.-M. Lagarde, H. Zahouani, y J.-M. Bergheau, "Characterization of the mechanical properties of skin by inverse analysis combined with the indentation test.", *J. Biomech.*, vol. 39, n.º 9, págs. 1603-1610, 2006.
- 10 [9] M. J. Koehler, T. Vogel, P. Elsner, K. König, R. Bückle, y M. Kaatz, "In vivo measurement of the human epidermal thickness in different localizations by multiphoton laser tomography", *Ski. Res. Technol.*, vol. 16, n.º 3, págs. 259-264, 2010.
- 15 [10] C. Sanchez, L. Rozes, F. Ribot, C. Laberty-Robert, D. Grosso, C. Sassoie, C. Boissiere, y L. Nicole, "Chimie douce": A land of opportunities for the designed construction of functional inorganic and hybrid organic-inorganic nanomaterials", *Comptes Rendus Chimie*, vol. 13, n.º 1-2, págs. 3-39, 2010.
- 20 [11] S. Hsu, A. M. Jamieson, y J. Blackwell, "Viscoelastic studies of extracellular matrix interactions in a model native collagen gel system", *Biorheology*, vol. 31, n.º 1, págs. 21-36, 1994.
- [12] X. Liang y S. A. Boppart, "Biomechanical properties of in vivo human skin from dynamic optical coherence elastography", *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 57, n.º 4, págs. 953-959, 2010.
- 25 [13] B. J. Bell, E. Nauman, y S. L. Voytik-Harbin, "Multiscale strain analysis of tissue equivalents using a customdesigned biaxial testing TSM biosensor", *Biophys. J.*, vol. 102, n.º 6, págs. 1303-1312, 2012.
- [14] R. B. Groves, S. A. Coulman, J. C. Birchall, y S. L. Evans, "An anisotropic, hyperelastic model for skin: Experimental measurements, finite element modelling and identification of parameters for human and murine skin", *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 18, págs. 167-180, 2013.
- 30 [15] J. Serup, G. B. E. Jemec, y G. L. Grove, *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin*, Second Edition -, CRC Press. 2006.
- 35 [16] J. M. Pereira, J. M. Mansour, y B. R. Davis, "Dynamic measurement of the viscoelastic properties of skin", *J. Biomech.*, vol. 24, n.º 2, págs. 157-162, 1991.
- [17] Z. Del Prete, S. Antonucci, A. H. Hoffman, y P. Grigg, "Viscoelastic properties of skin in Mov-13 and Tsk mice", *J. Biomech.*, vol. 37, n.º 10, págs. 1491-1497, 2004.
- 40 [18] H. G. Vogel, "Directional variations of mechanical parameters in rat skin depending on maturation and age", *J. Invest. Dermatol.*, vol. 76, n.º 6, págs. 493-497, 1981.
- [19] O. Lokshin y Y. Lanir, "Viscoelasticity and preconditioning of rat skin under uniaxial stretch: microstructural constitutive characterization", *J. Biomech. Eng.*, vol. 131, n.º 3, p. 031009, 2009.
- 45 [20] S. Derler y L. C. Gerhardt, "Tribology of skin: Review and analysis of experimental results for the friction coefficient of human skin", *Tribol. Lett.*, vol. 45, n.º 1, págs. 1-27, 2012.
- 50 [21] H. A. Wheeler, "Transmission-Line Properties of Parallel Strips Separated by a Dielectric Sheet", *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 13, n.º 2, págs. 172-185, Mar. 1965.
- [22] C. Ould Ehssein, "Système instrumental pour la rhéologie ultrasonore", Université de Cergy-Pontoise, 2006.
- 55 [23] E. Lopez, E. Latie, P. Gasser, y M. Rousseau, "Calcium improves skin health", *Househ. Pers. Care Today*, vol. 3, págs. 32-35, 2008.
- [24] P. Gasser, F. Arnold, L. Peno-Mazzarino, D. Bouzoud, M. T. Luu, E. Lati, y M. Mercier, "Glycation induction and antiglycation activity of skin care ingredients on living human skin explants.", *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 33, n.º 4, págs. 366-70, Ag. 2011.
- 60 [25] P. Leclaire, J. Goossens, L. Martinez, N. Wilkie-Chancelier, S. Serfaty, y C. Glorieux, "Study of the bending modes in circular quartz resonator 3Cs", *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 53, n.º 10, págs. 1934-1943, Oct. 2006.
- 65

- [26] W. Mason, "A Dynamic Measurement of the Elastic, Electric and Piezoelectric Constants of Rochelle Salt", *Phys. Rev.*, vol. 55, n.º 8, págs. 775-789, Abr. 1939.
- 5 [27] R. W. Cernosek, S. J. Martin, A. R. Hillman, y H. L. Bandey, "Comparison of lumped-element and transmissionline models for thickness-shear-mode quartz resonator 3C sensors", *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 45, n.º 5, págs. 1399-1407, Sep. 1998.
- 10 [28] G. Sauerbrey, "Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung" *Zeitschrift für Phys.*, vol. 155, n.º 2, págs. 206-222, Abr. 1959.
- [29] K. Keiji Kanazawa y J. G. Gordon, "The oscillation frequency of a quartz resonator 3C in contact with liquid", *Anal. Chim. Acta*, vol. 175, n.º C, págs. 99-105, 1985.
- 15 [30] H. L. Bandey, S. J. Martin, R. W. Cernosek, y A. R. Hillman, "Modeling the Responses of Thickness-Shear Mode Resonators under Various Loading Conditions.", *Anal. Chem.*, vol. 71, n.º 11, págs. 2205-14, Jun. 1999.
- 20 [31] A. Arnau, Y. Jiménez, y T. Sogorb, "Thickness-shear mode quartz crystal resonators in viscoelastic fluid media", *J. Appl. Phys.*, vol. 88, n.º 8, p. 4498, 2000.
- [32] S. J. Martin, V. E. Granstaff, y G. C. Frye, "Characterization of a Quartz Crystal Microbalance with Simultaneous Mass and Liquid Loading", *Anal. Chem.*, vol. 2281, n.º 26, págs. 2272-2281, 1991.
- 25 [33] C. O. Ehssein, S. Serfaty, P. Griesmar, E. Caplain, L. Martinez, y M. Gindre, "Kinetic reaction monitoring of acidified milk gels with a quartz resonator 3C: effect of temperature and gdl quantities", en *IEEE Inter. Ultrasonics, Ferroelectric, and Frequency Controls, 50th Conf.*, 2004, vol. 1, págs. 319-322.
- 30 [34] E. Caplain, C. Ould Ehssein, S. Serfaty, L. Martinez, J.-Y. Le Huérou, y M. Gindre, "Toward embedded viscosimeter using quartz crystal resonator", en *3rd Meeting IEEE Sensors*, Viena, Austria, 2004, p. octubre-octobre.
- [35] C. Ould Ehssein, J. Y. Le Huerou, L. Martinez, E. Caplain, N. Wilkie-Chancellier, M. Gindre, G. Gouedard, y P. Figuiere, "Kinetic study of silica gels by a new rheological ultrasonic investigation", *Ultrasonics*, vol. 44 supl. 1, págs. e881-5, Dic. 2006.
- 35 [36] A. C. Rowat, N. Kitson, y J. L. Thewalt, "Interactions of oleic acid and model stratum corneum membranes as seen by 2H NMR", *Int. J. Pharm.*, vol. 307, n.º 2, págs. 225-231, 2006.
- 40 [37] N. Y. Ryabova, M. A. Kiselev, S. Dante, T. Hauss, y A. M. Balagurov, "Investigation of stratum corneum lipid model membranes with free fatty acid composition by neutron diffraction.", *Eur. Biophys. J.*, vol. 39, n.º 8, págs. 1167-1176, 2010.
- 45 [38] X. Chen, S. Kwak, M. Lafleur, M. Bloom, N. Kitson, y J. Thewalt, "Fatty acids influence 'Solid' phase formation in models of stratum corneum intercellular membranes", *Langmuir*, vol. 23, n.º 10, págs. 5548-5556, 2007.
- 50 [39] D. Lee, J. N. Ashcraft, E. Verploegen, E. Pashkovski, y D. A. Wertz, "Permeability of model stratum corneum lipid membrane measured using quartz crystal microbalance", *Langmuir*, vol. 25, n.º 10, págs. 5762-5766, 2009.

REIVINDICACIONES

1. Biosensor de modo de cizallamiento de espesor (TSM) (1) que comprende:

- 5 - un medio de cultivo,
- un transductor de TSM (3) que comprende: un resonador de cuarzo de corte AT que presenta dos superficies exteriores opuestas (3A, 3B) y dos electrodos de metal (4A, 4B), estando cada electrodo de metal depositado sobre una de las dos superficies exteriores (3A, 3B),

10 caracterizado por que el biosensor de TSM (1) comprende además un explante de piel (2) vivo *ex vivo* en contacto con el medio de cultivo, comprendiendo el explante de piel (2) dermis (2A), epidermis (2B) y estrato córneo (2C), permitiendo el transductor de TSM (3) medir y convertir los parámetros eléctricos para determinar las características mecánicas del explante de piel (2) vivo y estando configurado para generar ondas de TSM en el explante de piel (2) vivo *ex vivo* y por que la dermis (2A) está en contacto con el transductor de TSM (3) y el estrato córneo (2C) está en contacto con el aire.

20 2. Biosensor de TSM (1) según la reivindicación 1 y receptáculo en el que está el biosensor de TSM (1), estando el biosensor de TSM (1) rodeado por medio de cultivo (5), estando el transductor de TSM (3) sumergido en el medio de cultivo (5) para mantener la dermis (2A) en el medio de cultivo (5) y el estrato córneo (2C) en contacto con el aire, permitiendo la supervivencia del explante de piel (2) durante por lo menos varias horas.

25 3. Biosensor de TSM (1) según la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo (5) se dispone sobre uno de los dos electrodos (4A, 4B), y en el que la dermis (2A) del explante de piel (2) está en contacto con dicho electrodo, para garantizar la supervivencia del explante de piel (2) sobre el transductor de TSM (3) por lo menos varias horas.

4. Biosensor de TSM (1) según las reivindicaciones 2 y 3, en el que el medio de cultivo (5) es un gel.

30 5. Biosensor de TSM (1) según la reivindicación 3, en el que el medio de cultivo (5) es una capa funcionalizada.

6. Biosensor de TSM (1) según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el electrodo presenta por lo menos una abertura que se llena con el medio de cultivo (5), permitiendo la supervivencia del explante de piel (2) durante por lo menos varias horas.

35 7. Biosensor de TSM (1) según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el transductor de TSM (3) comprende un sistema de monitorización con unos medios de monitorización y cálculo (31) que da acceso a una impedancia eléctrica equivalente adicional del biosensor de TSM (1) cargado mediante el explante de piel (2) vivo, indicada $Z = R + j X$, estando Z vinculada con el módulo de cizallamiento complejo $G = G' + j G''$, representativo de la viscoelasticidad de la piel a partir del circuito de Butterworth-van-Dyke (BVD) de elementos concentrados eléctricos equivalentes modificados, utilizando las ecuaciones siguientes:

$$R \cong K \rho_{piel} \sqrt{\frac{(|G(\omega)| + G'(\omega))}{2 \rho_{piel}}}$$

$$X \cong K \rho_{piel} \left(\sqrt{\frac{(|G(\omega)| - G'(\omega))}{2 \rho_{piel}}} + \omega h_{eff} \right)$$

45 en las que K es el factor de acoplamiento electromecánico, ρ_{piel} es la densidad de la piel, ω es la pulsación de resonancia, G' , G'' son respectivamente el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida correspondientes a las partes real e imaginaria del módulo de cizallamiento complejo G, y h_{eff} es la profundidad de la piel viva.

50 8. Biosensor de TSM (1) según la reivindicación 7, en el que los medios de monitorización y cálculo (31) integran un modelo eléctrico del biosensor mediante un circuito eléctrico,

estando el biosensor (1) modelado por un circuito eléctrico que comprende:

- 55 - una rama estática que modela el comportamiento eléctrico del cuarzo, y

- una rama dinámica paralela a la rama estática y que modela el comportamiento mecánico del cuarzo y el comportamiento mecánico de la piel,

5 comprendiendo la rama estática una resistencia y un condensador conectados en paralelo,

comprendiendo la rama dinámica en serie:

- 10 - un condensador, una autoinductancia y una resistencia que modelan el comportamiento mecánico del cuarzo, y
- la impedancia eléctrica equivalente adicional Z que modela el comportamiento mecánico de la piel.

15 9. Biosensor de TSM (1) según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los electrodos (4A, 4B) cubren la superficie total del resonador de cuarzo de corte AT.

10. Biosensor de TSM (1) según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el explante de piel (2) cubre la superficie total de un electrodo sobre el que se deposita.

20 11. Biosensor de TSM (1) según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los electrodos (4A, 4B) están realizados en oro.

25 12. Procedimiento para determinar las características mecánicas del explante de piel (2) vivo *ex vivo* que está en contacto con un medio de cultivo, comprendiendo el explante de piel (2) vivo dermis (2A), epidermis (2B) y estrato córneo (2C), utilizando un transductor de TSM (3) que comprende: un resonador de cuarzo de corte AT que presenta dos superficies exteriores opuestas (3A, 3B) y dos electrodos de metal (4A, 4B), estando cada electrodo de metal depositado sobre una de las dos superficies exteriores (3A, 3B), estando el procedimiento caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- 30 - (a) poner la dermis en contacto con el transductor de TSM (3), y el estrato córneo (2C) en contacto con el aire,
- (b) generar, mediante el transductor de TSM, ondas de TSM en el explante de piel (2) vivo *ex vivo*,
- 35 - (c) medir y convertir, mediante el transductor de TSM, parámetros eléctricos para determinar las características mecánicas del explante de piel (2) vivo.

40 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el explante de piel (2) vivo se pretrata, por ejemplo se hidrata o se deslipida.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 13, en el que el explante de piel (2) vivo se trata con por lo menos un producto, antes o después de su depósito sobre el transductor de TSM (3), para monitorizar los efectos de productos sobre la piel.

45 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el transductor de TSM (3) comprende un sistema de monitorización con unos medios de monitorización y cálculo (31) que da acceso a una impedancia eléctrica equivalente adicional del biosensor de TSM (1) cargado mediante el explante de piel (2) vivo, indicada $Z = R + j X$, estando Z vinculada con el módulo de cizallamiento complejo $G = G' + j G''$, representativo de la viscoelasticidad de la piel a partir del circuito de Butterworth-van-Dyke (BVD) de elementos concentrados eléctricos equivalentes modificados, utilizando las ecuaciones siguientes:

$$R \cong K \rho_{piel} \sqrt{\frac{(|G(\omega)| + G'(\omega))}{2 \rho_{piel}}}$$

$$X \cong K \rho_{piel} \left(\sqrt{\frac{(|G(\omega)| - G'(\omega))}{2 \rho_{piel}}} + \omega h_{eff} \right)$$

55 en las que K es el factor de acoplamiento electromecánico, ρ_{piel} es la densidad de la piel, ω es la pulsación de

resonancia, G' , G'' son respectivamente el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida correspondientes a las partes real e imaginaria del módulo de cizallamiento complejo G , y h_{eff} es la profundidad de la piel viva,

estando el biosensor (1) modelado por un circuito eléctrico que comprende:

5

- una rama estática que modela el comportamiento eléctrico del cuarzo, y
- una rama dinámica paralela a la rama estática y que modela el comportamiento mecánico del cuarzo y el comportamiento mecánico de la piel,

10

comprendiendo la rama estática una resistencia y un condensador conectados en paralelo,

comprendiendo la rama dinámica en serie:

15

- un condensador, una autoinductancia y una resistencia que modelan el comportamiento mecánico del cuarzo, y
- la impedancia eléctrica equivalente adicional Z que modela el comportamiento mecánico de la piel.

20

16. Utilización de un biosensor (1) de modo de cizallamiento de espesor (TSM) según una de las reivindicaciones 1 a 11, para someter a prueba el comportamiento mecánico *ex vivo* del explante de piel (2) vivo y para determinar las características viscoelásticas del explante de piel (2) vivo.

25

17. Utilización de un biosensor (1) de modo de cizallamiento de espesor (TSM) según una de las reivindicaciones 1 a 11, para detectar y/o seguir enfermedades de la piel o para analizar el efecto de un producto sobre el explante de piel (2).

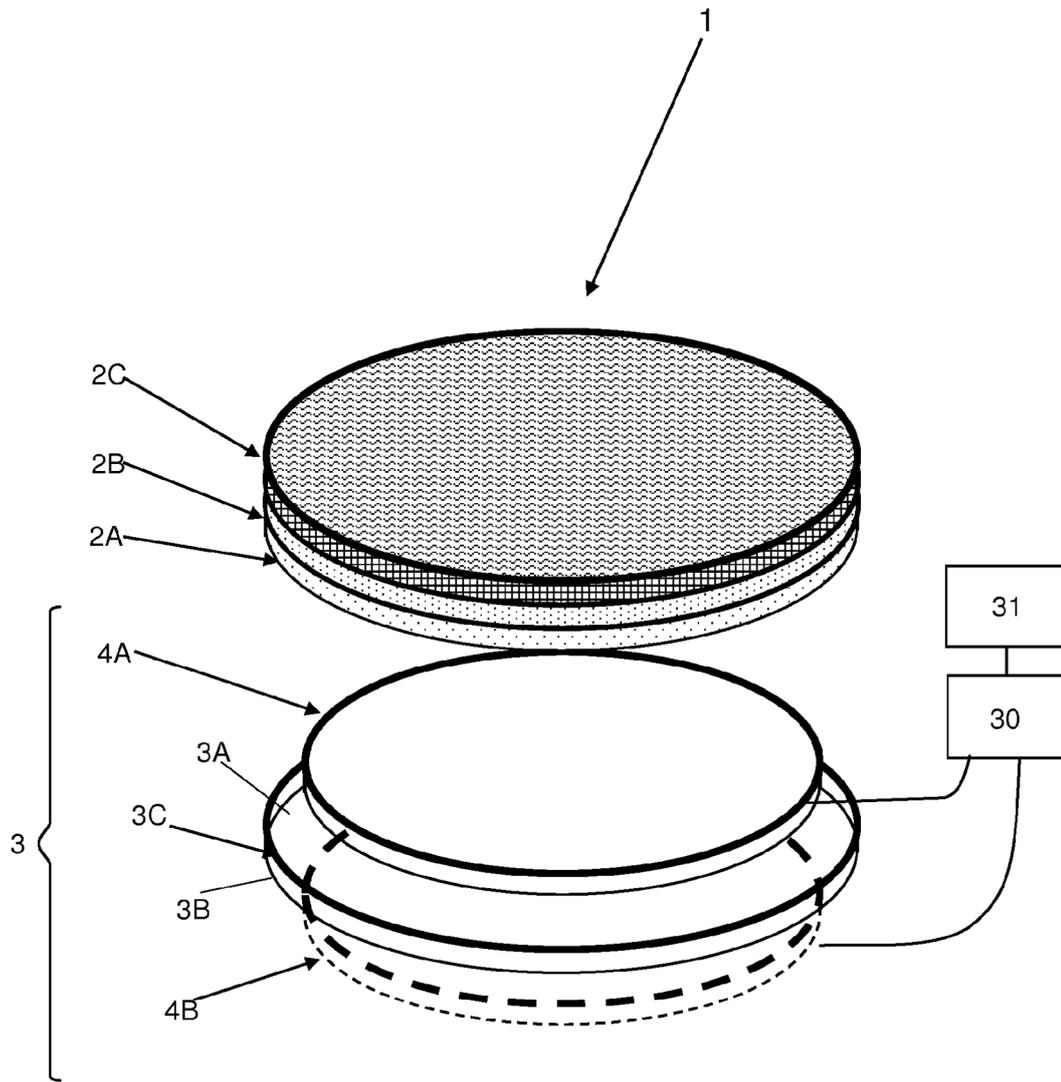
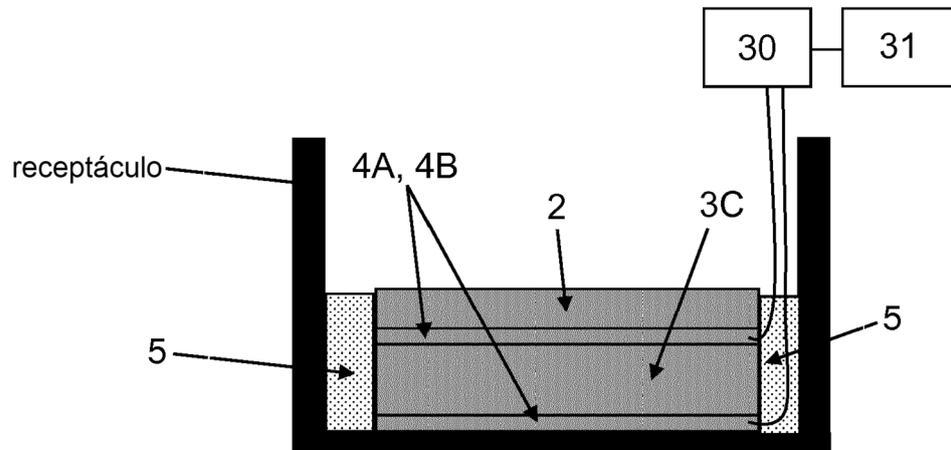


Figura 1

Figura 2



electrodos
excitación

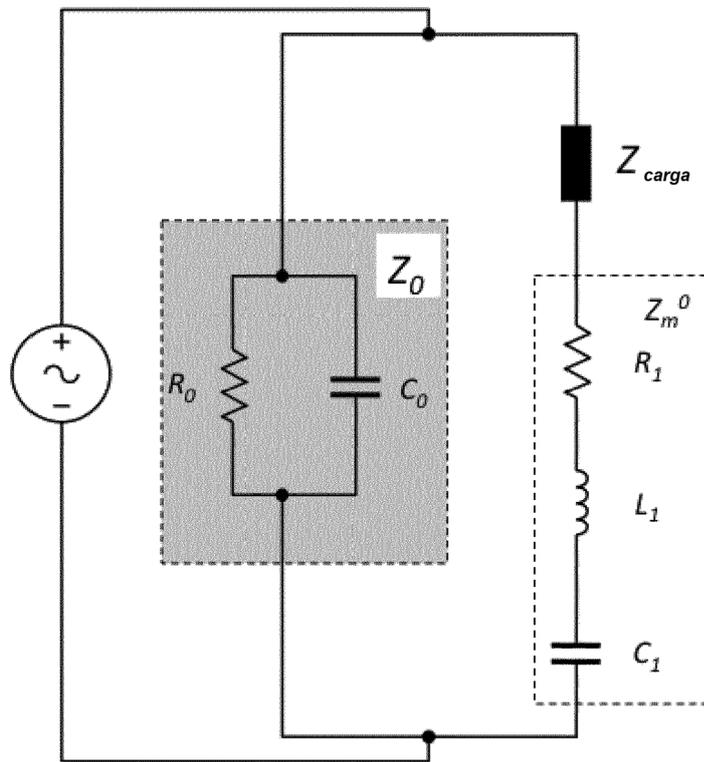


Figura 3

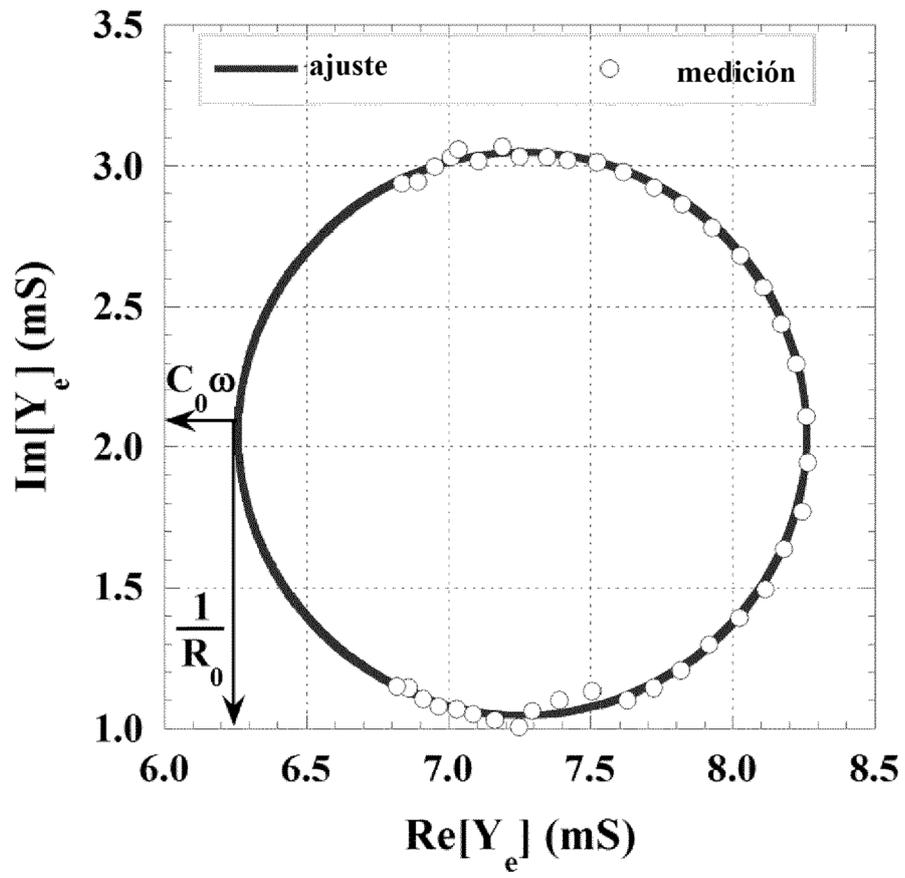


Figura 4

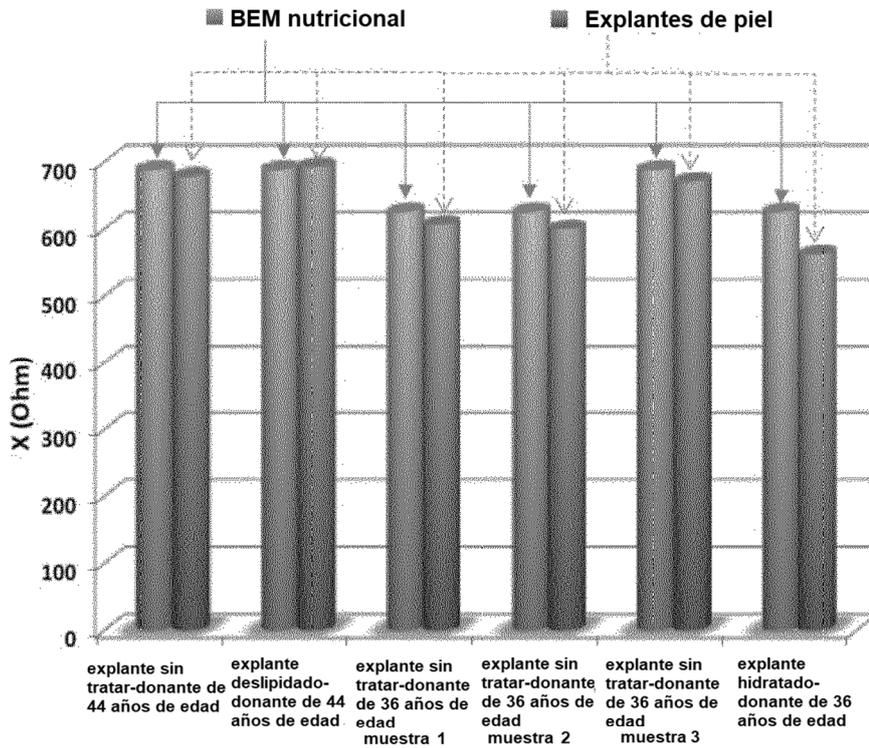


Figura 5

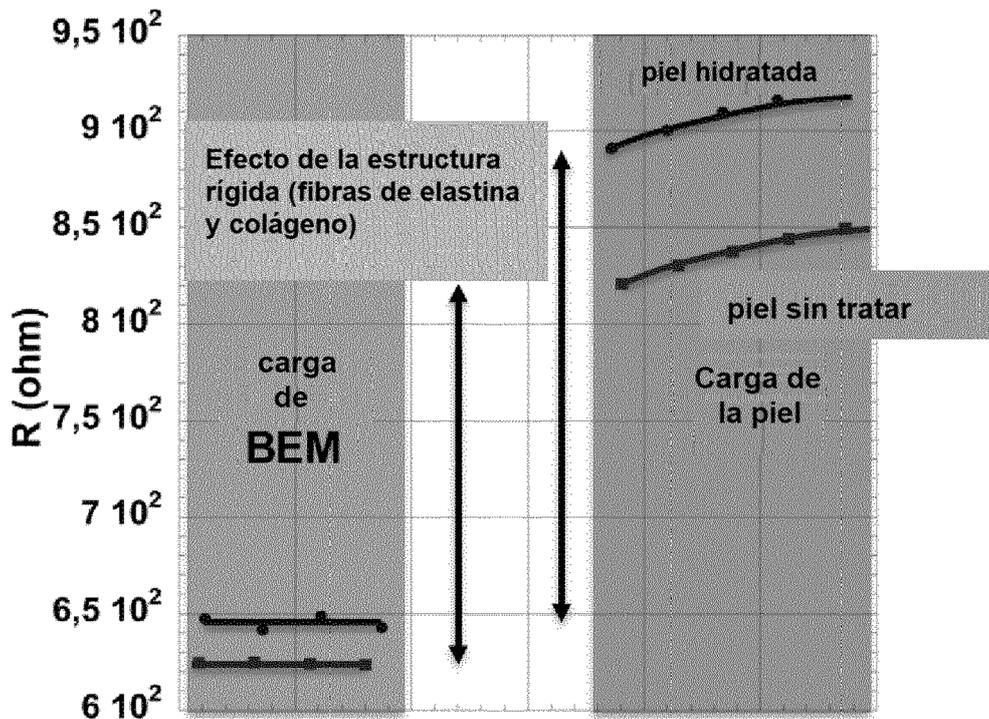


Figura 6

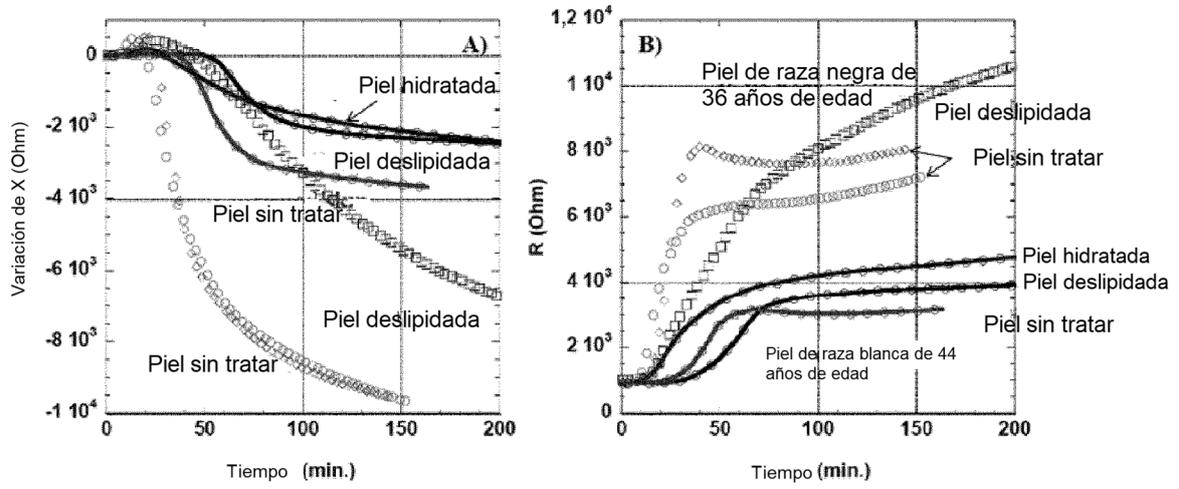


Figura 7

Figura 8

