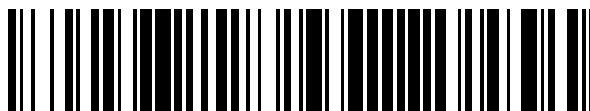


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 957**

51 Int. Cl.:

G01N 21/63 (2006.01)

G01N 15/00 (2006.01)

G01N 15/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2017 PCT/BE2017/000009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17120647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2017 E 17706135 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3403068**

54 Título: **Método para detectar o cuantificar partículas de negro de carbono y/o carbono negro**

30 Prioridad:

12.01.2016 GB 201600564

15.04.2016 GB 201606611

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

19.06.2020

73 Titular/es:

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN KU
LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT (50.0%)
Waaistraat 6 Box 5105
3000 Leuven, BE y
UNIVERSITEIT HASSELT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AMELOOT, MARCEL;
BOVÉ, HANNELORE;
NAWROT, TIM;
ROEFFAERS, MAARTEN;
STEUWE, CHRISTIAN y
VANDEVEN, MARTIN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 767 957 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

Método para detectar o cuantificar partículas de negro de carbono y/o carbono negro

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método sin etiquetas para detectar partículas carbonosas en líquidos, células y tejidos de origen biológico y medios portadores de origen no biológico, en particular dicho entorno no biológico con un fondo fluorescente, y más específicamente para medir y analizar partículas de negro de carbono y carbono negro en fluidos (p. ej., aguas residuales y orina) o tejidos (p. ej., placenta y hojas) con el uso de un láser con duraciones de pulso/femtosegundo que desencadenan una respuesta óptica instantánea sin la emisión de incandescencia de muestra inducida por calor.

Antecedentes

15 Dos formas de materiales carbonosos son el negro de carbono y el carbono negro. El negro de carbono (CB) consiste o comprende agregados aciniformes de partículas primarias con un contenido de carbono elemental mayor al 97% (ASTM International, West Conshohocken, Pa., 2013). Se produce a través de una combustión incompleta y bien controlada de compuestos orgánicos como el petróleo pesado o el aceite vegetal. Esto distingue el CB del hollín o el carbono negro (BC), el subproducto no deseado liberado durante los procesos de combustión incompleta, como en los escapes de los motores diesel y uno de los principales factores que contribuyen a la contaminación de partículas atmosféricas (L. Castro et al., Atmos. Environm., 1999, 33, 2771). Sin embargo, debido a la similitud (física) química, CB se usa ampliamente como un compuesto modelo para el hollín (C. Arnal et al., Combust. Sci. Technol., 2012, 184, 1191). Se estimó que la emisión total de carbono negro a nivel mundial era de aproximadamente 8,5 millones de toneladas después de haber aumentado constantemente durante la década anterior (R. Wang, Global Emission Inventory and Atmospheric Transport of Black Carbon: Evaluation of the Associated Exposure, 2015, Springer Thesis: Beijing, China. Como consecuencia de la creciente exposición ambiental y ocupacional a estas partículas carbonosas, una comprensión más profunda del impacto (eco) toxicológico de estos materiales es de importancia crítica. El material carbonoso o el carbono (material negro) generalmente se considera que tiene baja solubilidad en agua y fluorescencia débil (J. C. G. Esteves da Silva y H. M. R. Goncalves, Trends Anal. Chem., 2011, 30, 1327). Sin embargo, las nanopartículas de carbono con un rango de tamaño bien definido muy limitado por debajo de 10 nm pueden hacerse luminiscentes mediante modificaciones sintéticas laboriosas que producen estructuras de carbono de tamaño nano fluorescentes (H. T. Li et al J. Mat. Chem., 2012, 22, 24230). Los ejemplos son los puntos C fotoluminiscentes (nano puntos de carbono) que se pueden preparar a partir de precursores de carbono como el hollín de las velas (H. T. Li et al J. Mat. Chem., 2012, 22, 24230). Tal modificación posterior no puede realizarse directamente en experimentos in vivo en una muestra que contiene CB o BC u otras nanopartículas de carbono no fluorescentes.

Las mediciones del estado de la técnica en aire contaminado (J. C. Chow et al., Atmos. Res., 2009, 93, 874) se refieren a la fotometría de absorción y la incandescencia inducida por láser (LII) para determinar las concentraciones de partículas. Además, se han explorado métodos de etiquetado alternativos, como el etiquetado de radionúclidos de tecnecio-99-m en estudios epidemiológicos e investigaciones de toxicología (A. Nemmar et al., Circulation, 2002, 105, 411).

En LII, la emisión de materiales carbonosos se ha relacionado con la radiación del cuerpo negro de las partículas de CB severamente calentadas (A. Ferrari et al., Phys. Rvdo. Lett., 2006, 97, 187401), es decir, incandescencia. Ya se han propuesto varios modelos para explicar el origen de la incandescencia y su dependencia del poder de iluminación y la duración del pulso (I. Belousova et al., Opt. Commun., 2004, 235, 445; S. Zelensky, Semicon. Phys. Quantum. Optoelectron., 2004, 7, 190; J. J. Rulik et al., Semicon. Phys. Quantum. Optoelectron., 2007, 10, 6). Recientemente, importantes esfuerzos científicos se han centrado en la luz blanca (WL) de materiales carbonosos, incluido el grafeno (W. Strek et al., Light. Sci. Appl., 2015, 4, e237), fullerenos (B. Hamilton et al., Adv. Mater., 1993, 5, 583) y nanotubos de carbono (T. Imholt et al., Chem. Mater., 2003, 15, 3969). También para estos materiales, la radiación emitida se ha relacionado con la incandescencia.

Sin embargo, la incandescencia inducida por la emisión visible de partículas de CB en solución y materia biológica hasta ahora no ha sido ampliamente explorada, a pesar de los reportes de suspensiones de CB que sirven como limitadores ópticos y dispersores no lineales debido a su banda ancha y absorción plana. Dicha eficiencia de dispersión de luz no lineal inducida por incandescencia disminuye con el acortamiento de la duración del pulso (I. Belousova et al., Opt. Commun., 2004, 235, 445; S. Zelensky, Semicon. Phys. Quantum. Optoelectron., 2004, 7, 190). La interpretación de estos efectos no es sencilla, ya que dependen en gran medida de las condiciones experimentales (F. Fougéanet y J.-C. Fabre, MRS Proceedings, 1997, Cambridge Univ. Press, 293). Además, la emisión visible inducida por incandescencia de partículas CB en entornos acuosos requeriría intensidades láser más altas debido al transporte de calor mejorado con respecto a los entornos gaseosos, adicionalmente en fluidos biológicos, células y tejidos, esto desnaturizaría este entorno biológico debido al calentamiento de las partículas.

El documento US 2011/189702 A describe un método para detectar nanopartículas de carbono en una muestra analizando la luz de luminiscencia de dos fotones generada iluminando la muestra con luz láser pulsada de

femtosegundo en el rango espectral infrarrojo cercano. Las partículas son materiales compuestos que comprenden una estructura central basada en carbono que es pasivada en la superficie con un segundo material. Las partículas están destinadas a ser utilizadas para marcar estructuras diana en imágenes celulares.

- 5 Si bien los efectos adversos para la salud de la exposición a CB y/o BC generalmente se aceptan, todavía falta un enfoque directo y sin etiqueta para detectar partículas de CB/BC en fluidos y a nivel celular

La presente invención proporciona métodos que permiten la detección directa de partículas de CB y BC, en muestras relevantes como líquidos contaminados como agua y otros solventes, fluidos corporales y productos de consumo, así como células y tejidos biológicos expuestos por medio de detección de luz no relacionada con incandescencia y análisis bajo iluminación con duraciones de pulso de femtosegundo/subpicosegundo lo suficientemente cortas como para desencadenar una respuesta óptica instantánea sin la emisión de incandescencia de muestra inducida por calor. En la presente invención, observamos para cuatro especies diferentes de CB con diámetros que varían de 13 a 500 nm, que esta emisión bajo iluminación de femtosegundos es una propiedad general de las partículas CB/BC.

Un carácter muy distinguido de la presente invención, en contraste con los puntos C que tienen una banda de emisión estrecha, es que las especies CB o BC bajo iluminación láser ultrarrápida de femtosegundos/subpicosegundos muestran una respuesta espectral amplia que abarca al menos todo el rango visible de longitudes de onda. Una ventaja particular es que cuando el láser de femtosegundo ultrarrápido se enfoca en la muestra que contiene especies CB o BC (por ejemplo, en orina u otras muestras líquidas), la emisión de fondo proveniente de especies no CB o no BC puede filtrarse espectralmente. Por ejemplo, es una realización particular de la presente invención que al variar la intensidad de iluminación de femtosegundo/subpicosegundo y/o la longitud de onda de iluminación de femtosegundo/subpicosegundo, las longitudes de onda de emisión pueden ajustarse en la emisión de longitud de onda seleccionada en el violeta (380- 450 nm), azul (450-500 nm), verde (500-570 nm), amarillo (570-590 nm), naranja (560-620 nm) o rojo (620-750 nm). Por ejemplo, en una realización particular de la presente invención, cuando una muestra que comprende especies CB y/o BC se ilumina mediante un láser pulsado ultrarrápido, por ejemplo, un láser pulsado de femtosegundo, la longitud de onda de los pulsos láser se puede cambiar dentro del rango de 700 a 1200 nm, preferiblemente dentro del rango de 750 a 950 nm y/o la intensidad de la luz láser de femtosegundo se puede cambiar, hasta que la iluminación de las especies CB y/o BC se distinga de cualquier iluminación de ruido de muestra. En una realización de la presente invención, se usa una intensidad de láser ultrarrápida variable y/o una longitud de onda de láser ultrarrápida variable como una manija para separar el ruido, tal como la emisión de fondo y cualquier otro ruido que interfiera con la detección en longitudes de onda de emisión específicas de BC/CB, o cualquiera de la emisión de especies CB y/o BC. Por ejemplo, un filtro dicróico de paso corto de 750 nm puede separar las emisiones visibles de la iluminación infrarroja cercana de las especies CB y/o BC.

En una realización de la presente invención, después de que se genera una señal de emisión a partir de especies CB y/o BC mediante iluminación láser pulsada de femtosegundo/subpicosegundo, las señales de luz de emisión se guían a un sistema de detección de señal para detectar las señales de luz de las partículas de interés de las especies CB y/o BC. Las señales de entrada de diferentes detectores ópticos, por ejemplo, dos, que registran fotones de áreas espectrales suficientemente separadas, proporcionan la señal de entrada a un multiplicador digital separado, que es una combinación de un amplificador y un filtro electrónico. Estas señales se convierten cada una en un flujo de señal binaria mediante un convertidor analógico a digital (ADC). En consecuencia, las señales, desde la salida de los ADC, se reciben como entradas a un multiplicador digital. El multiplicador digital puede implementarse como un componente de hardware digital independiente, como un programa de software que se ejecuta en un procesador de ordenador o como cualquier otro mecanismo adecuado para multiplicar dos señales. La salida del multiplicador es una señal analítica muestreada que representa el producto (complejo) de las dos señales. La salida del multiplicador se proporciona a uno o más integradores. Al igual que el multiplicador digital, los integradores pueden implementarse como componentes de hardware digital, como un programa de software en un procesador de ordenador o como cualquier otro mecanismo adecuado para sumar las muestras de salida del multiplicador. El integrador suma series de muestras consecutivas de la salida del multiplicador para formar la señal de salida. La longitud de cada serie de muestras consecutivas dependerá de las propiedades conocidas o estimadas de las señales de interés. Cada tren de señal puede tener un tiempo de inicio asociado relacionado con el tiempo de muestra de la primera muestra en la serie consecutiva. Una ventaja particular de esta realización es que permite filtrar iluminaciones de especies CB y/o BC a partir de iluminaciones de muestra o medio portador.

En una realización particular, el tren de señal se transfiere, por consiguiente, por salida a hardware auxiliar tal como un microscopio láser, en particular tal como un microscopio de exploración láser. En una realización alternativa, el tren de señal se proporciona a una función de búsqueda para el recuento de partículas. Esta función de búsqueda puede implementarse como un procesador de señal digital, como un programa de ordenador operable en un sistema de procesamiento de datos, o como cualquier otro medio de procesamiento de señal adecuado, incluyendo hardware digital especializado. La función de búsqueda incluye un umbral que puede seleccionar selectivamente un pulso que excede una cierta magnitud de señal. La función de búsqueda cuenta estos eventos.

En una realización particular de la presente invención, la intensidad de iluminación pulsada de femtosegundo/subpicosegundo y/o la longitud de onda de iluminación de femtosegundo/subpicosegundo en dichas especies CB y/o BC o en dicha muestra que comprende especies CB y/o BC está modulada a la excitación de emisión

infrarroja cercana de dichas especies CB y/o BC. Un efecto positivo particular de este método es que distingue la emisión de especies CB y/o BC de la emisión de ruido de fondo y esto es particularmente útil para filtrar la autofluorescencia de fondo o la autofluorescencia del medio de muestra accidental. Una realización particular de la presente invención se refiere a la modulación de la iluminación ultrarrápida de femtosegundos de dichas especies BC y/o CB en una muestra de orina hasta que se alcanza la emisión infrarroja cercana. Esto es particularmente adecuado para distinguir las partículas CB y/o BC de cualquier otro ruido que interfiera con la detección en longitudes de onda de emisión específicas de BC/CB.

A medida que la radiación emitida se extiende por todo el espectro visible, la detección es sencilla y flexible. La propiedad única de la emisión de luz descrita permite la detección óptica y la localización inequívoca de partículas CB/BC en fluidos (corporales) como se muestra aquí usando orina y en entornos celulares, mientras que simultáneamente colocaliza diferentes componentes celulares usando varios fluoróforos específicos como se muestra aquí usando fibroblastos de pulmón humano.

Resumen de la invención

La invención se dirige a un método para detectar partículas de negro de carbono y/o carbono negro en una muestra como se especifica en la reivindicación 1 adjunta. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

El método puede emplearse para analizar o cuantificar relativamente estas partículas

- en líquidos tales como medios acuosos (por ejemplo, tales medios acuosos a una temperatura inferior a 90 °C, preferiblemente entre 1 °C y 80 °C y más preferiblemente entre 10 °C y 50 °C) donde se produce disipación de calor y calentamiento de las partículas carbonosas que resultan en incandescencia se previene, pero no se limita a sangre, plasma, saliva, esputo, orina u otros líquidos contaminados como las aguas residuales;

- o en células tales como, entre otras, células humanas, animales y vegetales que están fijas o vivas y tienen un contenido de agua intracelular superior al 40%, preferiblemente entre 40% y 95%, y más preferiblemente entre 50% y 70% de tal manera que la disipación de calor puede tener lugar;

- o en entornos complejos, como tejidos biológicos y medios portadores de origen no biológico, tales como pero no limitados a, tejidos humanos, animales y vegetales, y muestras de biopsia que están fijas o vivas in vitro o in vivo y consisten en células que tienen un contenido de agua intracelular superior al 40%, preferiblemente entre 40% y 95%, y más preferiblemente entre 50% y 70% para que pueda tener lugar la disipación de calor.

En la presente invención, la emisión no es emisión incandescente.

Las partículas absorbentes de la luz, tales como las partículas carbonosas, generalmente se aceptaban como no luminiscentes o débilmente luminiscentes debido a un enfriamiento interno eficiente de la energía de excitación.

La presente invención resuelve los problemas de la técnica relacionada de medir y/o detectar partículas carbonosas en líquidos a temperaturas moderadas donde puede tener lugar la disipación de calor y se evita el calentamiento de las partículas carbonosas que producen incandescencia. La emisión de luz blanca por partículas carbonosas secas ya se conoce en la literatura, sin embargo, en este caso, la emisión es causada por incandescencia, es decir, la emisión del cuerpo negro de partículas calentadas.

En particular, para materiales a base de carbono, esto significa calentar a miles de grados centígrados. Esta situación no se puede obtener fácilmente en ambientes húmedos (acuosos) debido a la rápida disipación de calor hacia el ambiente circundante. Además, la emisión de incandescencia no es instantánea ya que el objeto sigue emitiendo luz después de que el pulso de iluminación ha cesado mientras se enfría. Además, dicha emisión calentada no es adecuada para ambientes o muestras sensibles al calor, desnaturalización sensible al calor o explosivos sensibles al calor.

En una realización particular, la presente invención resuelve los problemas de la técnica relacionada de tal manera que los ajustes de formación de imágenes que significan la intensidad incidente, la potencia media y la longitud de onda en la muestra de los pulsos de láser de femtosegundos requeridos para la generación de emisiones son compatibles con material o entornos vivos, sensible al calor, sensibles a la desnaturalización con calor, y sensibles a la explosión de calor. La incandescencia, conocida por las personas capacitadas en el campo, no se consideraría, ya que requeriría poderes láser inaceptablemente altos aplicados durante largos períodos de tiempo para inducir el calentamiento requerido de partículas carbonosas en entornos acuosos que conducen a la destrucción de los materiales circundantes por el calentamiento y quemado local.

La intensidad de la iluminación generada por este método es suficiente para ser detectada por un fotomultiplicador, un fotodiodo de avalancha o cualquier otro sensor sensible a la luz visible o infrarroja cercana y la intensidad de la luz

blanca generada es suficiente para ser utilizada en un microscopio láser del estado de la técnica, en particular, como un microscopio de escaneo láser, o dispositivos ópticos similares, como la citometría de flujo.

Una realización particular de la presente invención se refiere a un método de inducción de emisión de partículas carbonosas, tales como CB o BC, en muestras de medición tales como líquidos (por ejemplo, fluido corporal animal), células (por ejemplo, células animales), tejidos de origen biológico y medios portadores de origen no biológico mediante la entrega de luz láser, con una duración de pulso de femto/subpicosegundo que desencadena una respuesta óptica instantánea de las partículas carbonosas dentro de dicha muestra de medición, y esto sin etiquetado y/o ningún pretratamiento de las partículas carbonosas. Tal método de análisis es particularmente adecuado para analizar CB, BC y otras partículas carbonosas ordinarias tales como partículas carbonosas derivadas de la combustión sin funcionalización adicional de las partículas o tales como partículas carbonosas de contaminación industrial o ambiental.

La presente divulgación también se refiere a un aparato para analizar partículas carbonosas ordinarias en líquidos, células y entornos complejos tales como tejidos biológicos y medios portadores de origen no biológico, comprendiendo dicho aparato

- una sección de distribución de muestras de medición para distribuir una muestra de control de líquido y un alícuota predefinida de muestra líquida o cualquier otra muestra que contenga nanopartículas de carbono suspendidas en líquido junto con fluido de revestimiento de enfoque hidrodinámico;

- una sección de iluminación y detección ópticas que comprende un láser que suministra pulsos con duraciones de pulso de femto/subpicosegundo lo suficientemente cortas como para desencadenar una respuesta óptica instantánea no relacionada con incandescencia;

- un elemento de enfoque tal como un objetivo o cualquier otra lente o espejo de enfoque con una apertura numérica preferiblemente pero no necesariamente por encima de uno;

- elementos de recepción y detección de luz para detectar preferiblemente la luz emitida desde la muestra en la dirección del láser (hacia adelante);

- un elemento receptor de luz para recibir y detectar luz emitida hacia atrás; y una sección de medición para medir partículas carbonosas, como CB o BC, en líquidos, células y tejidos de medios biológicos y portadores de origen no biológico, en base a emisiones no relacionadas con incandescencia detectadas por la sección de detección óptica.

La presente divulgación también proporciona un método de detección de contaminación de partículas CB y/o BC que reside en organismos eucariotas, tales como plantas y animales. Es especialmente adecuado para mamíferos, el método comprende: (i) la recolección de una muestra del organismo eucariota; y (ii) análisis de la presencia o la cantidad de partículas CB y/o BC en dicho organismo eucariota sometiendo la muestra a pulsos láser de femtosegundos/subpicosegundos y analizando la emisión de luz de las partículas CB y/o BC en dicha muestra. En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para detectar partículas CB y/o BC en una muestra biológica, que comprende: (a) irradiar dicha muestra biológica con pulsos láser de femtosegundo/subpicosegundo y (b) detectar la presencia o ausencia de partículas CB y/o BC en dicha muestra por la luz visual emitida. En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para el análisis de presencia o cantidad de partículas CB y/o BC en una muestra, que comprende la etapa de inducción de emisión de luz visual (por ejemplo, emisión de luz blanca) desde las partículas CB y/o BC provocadas por pulsos láser de femtosegundos/subpicosegundos y análisis de la emisión de luz. Estas realizaciones de la divulgación distinguen ventajosamente las emisiones de partículas CB y/o BC del ruido de emisión de fondo de la muestra o matriz portadora. De acuerdo con la invención, la duración del pulso es inferior a 500 femtosegundos, la tasa de repetición es superior a 1 MHz con una potencia promedio inferior a 20 mW, y la longitud de onda de los pulsos láser de femtosegundo varía de 700 a 1200 nm. De acuerdo con la invención, las partículas CB y BC se analizan o cuantifican en medios a una temperatura inferior a 90 °C.

Al usar un sistema apropiado es posible que las partículas CB y BC a analizar o cuantificar estén en entornos complejos como fluidos corporales como sangre u orina o en que las partículas CB y BC que se analizarán o cuantificarán se encuentran en tejidos como hojas de hiedra o placenta. Esta invención puede estar además en conjunción con la intensidad de la luz blanca detectada por un fotomultiplicador o un microscopio láser, en particular un microscopio de exploración láser. De acuerdo con la invención, las partículas de negro de carbono (CB) y/o carbono negro (BC) están libres de etiquetas, las partículas de negro de carbono (CB) y/o carbono negro (BC) se encuentran sin etiquetado o ningún pretratamiento y/o las partículas de negro de carbono (CB) y/o carbono negro (BC) permanecen a temperaturas moderadas para que la emisión no sea causada por incandescencia y por lo tanto biocompatible.

En una realización adicional de la divulgación, un analizador de fluidos corporales para medir partículas de negro de carbono (CB) y/o carbono negro (BC) en fluidos corporales, está configurado de tal manera que la medición de la contaminación de partículas de negro de carbono y/o carbono negro es llevado sobre dicho fluido corporal sin etiquetar o funcionalizar dichas partículas de contaminación, por lo que el analizador de fluidos corporales comprende: un láser pulsado de femtosegundo/subpicosegundo, un mecanismo de muestreo para tomar una muestra de fluido corporal de

un recipiente de muestra o para recibir dicho recipiente de muestra para llevar a cabo irradiaciones de pulsos de láser de femtosegundos/subpicosegundos en la muestra de fluido corporal, un mecanismo sensor para llevar a cabo una medición visual de la emisión de luz para medir la contaminación de negro de carbono y/o carbono negro en dicha muestra. Algunas de las técnicas descritas anteriormente pueden realizarse como que el láser pulsado de femtosegundo/subpicosegundo del aparato comprende un láser de femtosegundo ultrarrápido, que el aparato comprende una entrega de haz estacionario o de exploración para enfocar la luz láser en la muestra. Algunas de las técnicas descritas anteriormente pueden incorporarse como que el mecanismo de láser de pulso de femtosegundo/subpicosegundo del aparato está configurado para generar pulsos con longitudes de onda que varían de 750 a 950 nm o el mecanismo de láser de pulso de femtosegundo/subpicosegundo está configurado para generar pulsos con longitudes de onda que oscilan entre 700 y 1200 nm.

El mecanismo de láser pulsado de femtosegundo/subpicosegundo en dicho aparato está configurado para generar pulsos con duraciones más cortas que 1000 femtosegundos y preferentemente más corto que 500 femtosegundos, que el mecanismo de láser de pulso femtosegundo está configurado para generar pulsos con una tasa de repetición preferiblemente superior a 1 MHz, que el láser de pulso de femtosegundo está configurado para generar luz de iluminación con una potencia promedio de 4 a 6 mW y/o que el láser de pulso de femtosegundo está configurado para generar luz de iluminación con una potencia promedio por debajo de 20 mW. Otro aspecto, de la presente invención, proporciona el aparato de acuerdo con cualquiera de las declaraciones anteriores, que comprende: a) una sección de distribución de muestras de medición configurada para distribuir una muestra de control de líquido y una alícuota predefinida de muestra de líquido; b) una sección de detección óptica que comprende: i) el mecanismo de láser pulsado de femtosegundos/subpicosegundos, ii) un elemento receptor de luz hacia adelante configurado para detectar la luz hacia adelante emitida por la muestra, y configurado además para emitir una señal de salida de luz hacia adelante y iii) un elemento receptor de luz hacia atrás configurado para detectar la luz hacia atrás emitida desde la muestra, y configurado además para emitir una señal de salida de luz hacia atrás. Además, este aparato se puede conectar física y funcionalmente con un dispositivo de procesamiento que comprende una unidad de procesamiento (CPU) y un dispositivo de almacenamiento de memoria. Esto puede ser una conexión directa con un ordenador o una conexión funcional con una unidad de sistema de procesamiento remoto que incluye un programa ejecutable de ordenador. Dicho programa ejecutable por ordenador está configurado para detectar y analizar las señales de dicho elemento receptor de luz hacia adelante y elemento receptor de luz hacia atrás. Aún en una realización particular, el programa ejecutable por ordenador está configurado para comparar las señales de medición con las señales de referencia.

Realizaciones ilustrativas de la invención

La siguiente descripción detallada de la invención se refiere a los dibujos adjuntos. Los mismos números de referencia en diferentes dibujos identifican los mismos elementos o elementos similares. Además, la siguiente descripción detallada no limita la invención. En cambio, el alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a ciertos dibujos, pero la invención no está limitada a los mismos sino solo por las reivindicaciones. Los dibujos descritos son solo esquemáticos y no limitativos. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede ser exagerado y no dibujado a escala con fines ilustrativos. Las dimensiones y las dimensiones relativas no corresponden a reducciones reales a la práctica de la invención.

Además, los términos primero, segundo, tercero y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos así utilizados son intercambiables en circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden funcionar en otras secuencias que las descritas o ilustradas en el presente documento.

Además, los términos superior, inferior, sobre, debajo y similares en la descripción y las reivindicaciones se usan con fines descriptivos y no necesariamente para describir posiciones relativas. Debe entenderse que los términos así utilizados son intercambiables en circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden funcionar en otras orientaciones que las descritas o ilustradas en el presente documento.

Debe observarse que el término "que comprende", utilizado en las reivindicaciones, no debe interpretarse como restringido a los medios enumerados a continuación; no excluye otros elementos o pasos. Por lo tanto, debe interpretarse como que especifica la presencia de las características, enteros, pasos o componentes indicados, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, enteros, pasos o componentes, o grupos de los mismos. Por lo tanto, el alcance de la expresión "un dispositivo que comprende los medios A y B" no debe limitarse a los dispositivos que consisten únicamente en los componentes A y B. Significa que con respecto a la presente invención, los únicos componentes relevantes del dispositivo son A y B.

Ejemplos

Todos los productos químicos se compraron de Sigma-Aldrich (Bélgica) a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1 Caracterización de partículas de negro de carbono: En este estudio se utilizaron cuatro tipos de partículas de negro de carbono (CB): nanopulvo de negro de carbono ultrafino (ufPL; PlasmaChem GmbH, Alemania), Printex 90 ultrafino (ufP90; Orion Engineered Carbons, Alemania), nanopulvo de negro de carbono conductor (CCB; US Research Nanomaterials, EE. UU.) Y nanopulvo de carbono fino mesoporoso (fCB; Sigma-Aldrich, Bélgica). Los diámetros aerodinámicos medios determinados por los fabricantes son 13, 14, 150 y 300 nm para ufPL, ufP90, CCB y fCB, respectivamente (Tabla 2). Los tamaños promedio de partícula primaria y los niveles de agregación de los CB se confirmaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM; Tecnai G², esprit twin, FEI, Países Bajos), figura 23). Se prepararon suspensiones acuosas (2 mg/ml), se ultrasonicaron durante 30 minutos y se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta su uso posterior. Inmediatamente antes de su uso, las suspensiones originales se ultrasonicaron durante 20 minutos antes de la dilución en agua, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Life Technologies, Bélgica) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS; Biochrom AG, Alemania), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Los diámetros hidrodinámicos de las partículas suspendidas en agua ultrapura y el medio de cultivo celular suplementado se midieron mediante dispersión dinámica de luz con un analizador de partículas ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corp., EE. UU.), Tabla 2. Este instrumento también se usó para la determinación del potencial Zeta de los CB en solución de cloruro de potasio (KCl; 1 mM, pH 7.4) y medio de cultivo celular suplementado.

Ejemplo 2 Imágenes CB en diversas soluciones, aire y polidimetilsiloxano: Las partículas CCB se dispersaron a una concentración de 600 µg/ml en agua ultrapura, etanol (Etanol absoluto, VWR Chemicals, Bélgica), glicerol (Glycerol BioXtra ≥99%, Sigma-Aldrich, Bélgica) y aceite de microscopio (Immersion Oil 518 F, Carl Zeiss, Alemania), y una mezcla de relación de peso 10:1 de polímero base de polidimetilsiloxano (PDMS) y agente de curado (Dow Corning, Alemania) se desgasificó a 0.55 bares y se curó durante 30 minutos a 70°C. Las soluciones se prepararon usando los mismos pasos de ultrasonificación como se describió anteriormente y la muestra seca se preparó secando al aire una gota de CCB en suspensión sobre un portaobjetos de vidrio. Las imágenes se recogieron utilizando un Zeiss LSM510 META NLO (Carl Zeiss, Alemania) montado en un Axiovert 200 M equipado con un láser pulsado de femtosegundo (810 nm, 150 fs, 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.) Sintonizado a una longitud de onda central de 810 nm con una potencia radiante de 5 o 10 mW en la posición de la muestra y utilizando un objetivo de inmersión en agua de 40 ×/1.1 (LD C-Apochromat 40×/1.1 W Korr UV-Vis-IR, Carl Zeiss). Las imágenes 1024×1024 resultantes con un tamaño de píxel de 0.22 µm se registraron con un tiempo de permanencia de píxel de 1.6 µs a temperatura ambiente.

Ejemplo 3 Espectros de absorción CB: Los espectros de absorción de la suspensión CB se midieron con un espectrómetro Lambda 950 UV/Vis/NIR (Perkin Elmer, EE. UU.) De doble haz, doble monocromador, registro de relación espectrofotómetro UV/Vis/NIR. Las suspensiones se prepararon como se describe anteriormente y se midieron en una cubeta de cuarzo (1 cm de longitud del camino óptico) inmediatamente después de la preparación para minimizar la sedimentación. Se registraron escaneos individuales en el rango espectral visible entre 400 y 800 nm con una velocidad de escaneo de 0.25 nm/s y un ancho de hendidura de 5 nm.

Ejemplo 4 Espectros de emisión CB: Las suspensiones CB estaban contenidas en cámaras ópticas fabricadas por dos diapositivas de cubierta de vidrio unidas por cinta adhesiva de doble cara (8153LE, 3M, Bélgica) con un orificio central perforado de 5 mm. Estas suspensiones de CB o partículas de CB secadas en un vidrio de cubierta (Figura 24) se excitaron con un láser de zafiro de titanio de femtosegundo convencional (810 nm, 150 fs, 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.). La potencia de iluminación se estableció en 8 mW después de un objetivo aéreo de 60×/0.95 (CFI Plan Apo Lambda 60×/0.95, Nikon, Japón). Un filtro dicróico de paso corto de 750 nm estaba separando la emisión visible de la iluminación infrarroja cercana. La luz emitida se enfocó en un agujero y luego se reflejó en un espectrógrafo con una cámara EM-CCD (ImagEM Enhanced C9100-13, Hamamatsu, Japón). Un filtro de paso corto adicional bloqueó cualquier luz láser fundamental. Los tiempos de integración de 45 s fueron suficientes para generar espectros con una alta relación señal a ruido (>100).

Ejemplo 5 Conteo de fotones individuales con correlación de tiempo: Después de la iluminación de femtosegundos (810 nm, 80 MHz, 5 mW) de los CB suspendidos en agua ultrapura o secados en un vidrio de cobertura, la respuesta temporal de la señal emitida se detectó usando un tubo fotomultiplicador GaAsP (PMT; 7422, Hamamatsu, Alemania) después del filtrado espectral utilizando un espejo dicróico KP 650, un filtro de paso corto KP 685 y un filtro de paso de banda (BP) 450-650. El PMT estaba conectado a una tarjeta SPC830 (Becker y Hickl, Alemania) que estaba sincronizada con el tren de pulsos del láser. Las grabaciones de las imágenes de 256×256 píxeles con un tamaño de píxel de 0.11 µm se realizaron utilizando un tiempo de permanencia de píxeles de 6.4 µs.

Ejemplo 6 Raman Spectra CBs: Los espectros Raman se recogieron con una cámara CCD (Newton, Andor, Reino Unido) equipada con un monocromador de rejilla abierta (IHR320, Horiba, Japón) con una rejilla de 1200 l/mm. Se usó un láser de helio neón de 633 nm con una potencia promedio en la muestra de 15 mW (Research and Electro-Optics INC, EE. UU.). La señal Raman pasó un filtro de paso largo de 645 nm después de un orificio de 100 µm para la detección confocal y el monocromador de rejilla. El ancho de la ranura se ajustó a 2000 µm. Las muestras de CB suspendidas estaban contenidas en las cámaras ópticas descritas anteriormente. El tiempo de integración se estableció en 10 s y se muestran promedios de 6 escaneos. Los datos se recogieron en una muestra de polvo seco en aire a temperatura ambiente. Los espectros Raman para todas las muestras recolectadas con iluminación láser de 633 nm mostraron picos D y G muy amplios típicos del carbono amorfo

Ejemplo 7 Conversión ascendente de femtosegundos: Se usó un sistema láser amplificador paramétrico óptico doble de femtosegundos amplificado como fuente de iluminación. La potencia del láser se ajustó a 150 μ W (150 nJ/pulso) en la posición de la muestra y la luz emitida por la muestra se recogió eficientemente utilizando un espejo parabólico fuera del eje. La emisión se filtró utilizando filtros de paso largo para suprimir la luz dispersa, dirigida y superpuesta con un pulso de puerta (810 nm, ca. 10 μ J) derivado del amplificador regenerativo en un cristal de triborato de litio. Al ajustar el ángulo incidente de estos dos haces en relación con el plano de cristal, se generó la frecuencia de suma de la luz y el pulso de la puerta. Las huellas resueltas en el tiempo se registraron luego detectando esta luz de frecuencia suma mientras se cambiaba el retraso relativo del pulso de la puerta frente al tiempo de iluminación de la muestra. La activación de fluorescencia se realizó bajo condiciones de ángulo mágico en ventanas de tiempo de 6, 50 y 250 ps.

La detección monocromática en modo heterodino se realizó utilizando un tubo fotomultiplicador (R928, Hamamatsu, Japón) colocado en la segunda salida del espectrógrafo montado detrás de una ranura. La detección óptica de heterodino es una técnica altamente sensible para medir cambios muy débiles en la absorción inducida por un haz de bomba de frecuencia modulada. La señal eléctrica del tubo fotomultiplicador fue activada por un promediador tipo boxcar (SR250, Stanford Research Systems, EE. UU.) y detectada por un amplificador de bloqueo (SR830, Stanford Research Systems, EE. UU.).

Se colocó un filtro BP adicional de 260-380 nm frente al monocromador para rechazar la luz de la iluminación y el pulso de la puerta. La función de respuesta del instrumento (IRF) de esta configuración (incluidas las fuentes láser) se determinó mediante la detección de luz dispersa del pulso láser en condiciones idénticas y se encontró que era aproximadamente 120 fs (FWHM). Este valor se usó en el análisis de todas las mediciones para el ajuste de curvas usando la reconvolución iterativa de los conjuntos de datos mientras se asumía una forma gaussiana para el IRF. La muestra se preparó en una concentración que produjo una absorbancia de ca. 0.4 por mm en la longitud de onda de iluminación y estaba contenido en una cubeta de cuarzo con una longitud de trayectoria óptica de 1 mm. Para mejorar la relación señal/ruido, cada medición se promedió 15 veces en 256 posiciones de retraso, donde una posición de retraso se conoce como el intervalo de tiempo entre la llegada de la bomba y los pulsos de compuerta en la posición de muestra.

Ejemplo 8 Condiciones de cultivo celular: Se mantuvieron células de fibroblastos de pulmón fetal humano (línea celular MRC-5, ATCC CCL-171, LGC Standards, Francia) (37°C, 5% de CO₂) en Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Cuando se alcanzó una confluencia del 80-90%, las células se subcultivaron rutinariamente. Las células para la obtención de imágenes se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo y se incubaron durante la noche para permitir la adherencia celular. Después de lavar tres veces con PBS, las células se trataron con 200 μ l de medio celular que contenía 5 μ g/cm² de partículas CB. Después de la exposición durante varios períodos de tiempo (4, 8 y 24 h), las células se lavaron tres veces con IMDM antes de realizar la inmunohistoquímica. Las células que no se sometieron a tratamiento CB se usaron como controles en los diversos puntos de tiempo.

Ejemplo 9 Inmunohistoquímica: Las células se fijaron usando paraformaldehído al 4% que contenía sacarosa al 4% en PBS durante 20 min. La permeabilización y el bloqueo se realizaron durante 2 h utilizando Triton X-100 al 0.3%, albúmina de suero bovino al 1% y suero de cabra al 10% (Merck Millipore, Bélgica) en PBS que contenía glicina 0.3 M (VWR Chemicals, Bélgica) y sacarosa al 5%. Los anticuerpos se diluyeron en un tampón de bloqueo que consiste en BSA al 1% y Triton X-100 al 0.1% en PBS. Los anticuerpos primarios fueron anti- α -tubulina de ratón monoclonal (1:1,000 durante 1 h a temperatura ambiente, Sigma-Aldrich, Bélgica), vimentina antihumana de rata monoclonal (10 μ g/ml durante 3 h a temperatura ambiente, Bio-Techne, Reino Unido), y anti-paxilina de conejo monoclonal (1:100 durante la noche a 4°C, Abcam, Reino Unido). Los anticuerpos secundarios fueron Alexa Fluor 488 antirratón de burro, Alexa Fluor 555 antirata de cabra y Alexa Fluor 647 anticonejo de cabra (1:250, 1 h, Life Technologies, Bélgica). Todos los lavados se realizaron tres veces con PBS durante al menos 5 min. Antes de la imagen confocal, se aspiraban todos los pocillos y se agregaban 200 μ l de Immu-Mount (Thermo Scientific Shandon™ Immu-Mount™, Thermo Fisher Scientific, Alemania).

Ejemplo 10 Imagen de microscopía de escaneo láser de CB inmersas en por células MRC-5: Todas las imágenes se recogieron a temperatura ambiente utilizando un cabezal de escaneo Zeiss LSM510 META NLO montado en un microscopio de escaneo láser invertido (Zeiss Axiovert 200 M, Alemania) y un objetivo de inmersión en agua 40 $\times$ /1.1. Las partículas CB se iluminaron con un pulso láser de femtosegundo y una potencia láser promedio de 4 mW en la muestra (810 nm, 150 fs, 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.). Se observó la emisión de las partículas en el modo no desescaneado después de la separación espectral y el filtrado de la señal y se usó un filtro 400-410 BP para filtrar adicionalmente la luz de emisión. En el modo desescaneado, la señal emitida se detectó con un BP 650-710. El agujero se abrió por completo. Para evitar la diafonía con la emisión de luz blanca CB cuando se utilizaron imágenes secuenciales de imágenes de estructuras celulares marcadas con fluoróforo.

Para obtener imágenes del citoesqueleto de tubulina de las células, el microscopio se acopló a un láser de iones de argón refrigerado por aire de 30 mW (LASOS Lasertechnik GmbH, Alemania) que emite a 488 nm (~3 μ W de potencia radiante máxima en la muestra). El filtro de paso de banda 500-530 se usó para filtrar la señal de emisión. Para obtener imágenes tanto del citoesqueleto de actina como de la célula completa, se realizó la excitación a 543 nm utilizando un

láser de helio neón de 5 mW (LASOS Lasertechnik GmbH, Alemania, ~3 μ W de potencia radiante máxima en la muestra). El filtro de paso de banda 565-615 se usó para filtrar la señal de emisión. Las imágenes de 1024×1024 resultantes con un tamaño de píxel de 0.06 μ m se registraron utilizando un tiempo de permanencia de píxel de 14.2 μ s. Se usó un tamaño de agujero fijo de 100 μ m.

Ejemplo 11 Resultados

En este estudio, se usa una variedad de partículas carbonosas, representativas de aquellas a las que los humanos están típicamente expuestos, que van desde polvos utilizados en máquinas copiadoras hasta materiales que generalmente se emplean como modelo para el hollín. La información sobre las características fisicoquímicas de estos diferentes materiales comerciales CB (ufPL, ufP90, CCB y fCB) se puede encontrar en la Tabla 2. De acuerdo con los datos del fabricante, el diámetro aerodinámico de las partículas varía entre 13 y 500 nm. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figuras 1B y 23) muestran la apariencia típica de CB que consiste en agregados aciniformes de partículas de carbono primario con forma arbitraria. Estas imágenes TEM y los resultados de la dispersión dinámica de la luz resumidos en la Tabla 2 muestran que las partículas CB se agregan cuando se suspenden en soluciones acuosas y absorben las proteínas corona del medio completo en su superficie, lo que da como resultado un diámetro hidrodinámico aumentado y un potencial zeta correspondiente a aproximadamente -20 mV independientemente de su potencial nativo. En conclusión, las características fisicoquímicas de las diferentes partículas de CB en suspensión son similares, aunque al seleccionar las partículas buscamos la mayor diferencia posible.

La figura 1C muestra CB suspendido en agua ultrapura, etanol y glicerol iluminado con un láser de femtosegundo a 810 nm (150 fs, 80 MHz) y registrado utilizando un microscopio comercial de escaneo láser de múltiples fotones. Se detectaron señales intensas con un filtro de paso de banda de emisión de 450 a 650 nm delante del detector. Dependiendo del medio de suspensión, la potencia del láser debe ajustarse para generar una intensidad de emisión similar: en glicerol y aceite de inmersión, la potencia de iluminación era aproximadamente el doble que la del experimento en etanol o agua (figura 24). Obsérvese la mancha horizontal de las partículas CB en la figura 1C (tiempo de permanencia de píxeles de 1.60 μ s, tamaño de píxeles de 220 nm). Este fenómeno se observa en todas las combinaciones de velocidades de escaneo y acercamiento (datos no mostrados), lo que sugiere la susceptibilidad de las partículas a la captura óptica en estas condiciones. Esta hipótesis se ve respaldada por la ausencia de esta mancha cuando las partículas CB están incrustadas en polidimetilsiloxano (figura 25). La captura por pulsos láser de femtosegundo ya se ha demostrado para otros tipos de nanopartículas (A. Usman et al., Sci. Prog., 2013, 96, 1; A. Usman et al., Femtosecond trapping efficiency enhanced for nano-sized silica spheres, 2012, 845833).

Se realizaron mediciones espectroscópicas adicionales para racionalizar la emisión de luz visible observada bajo iluminación de infrarrojo cercano de femtosegundo.

En primer lugar, descartamos la fotoluminiscencia (PL) reportada para partículas carbonosas muy pequeñas (por debajo de 10 nanómetros) (S. Ghosh et al., Nano Lett., 2014, 5656; Q. Li et al., J. Phys. Chem., 2010, 114, 12062) como causa de la emisión observada. Las partículas carbonosas, en particular el hollín, consisten o comprenden partículas agregadas que son de naturaleza heterogénea y, por lo tanto, contienen múltiples especies absorbentes posiblemente responsables de las transiciones de radiación. Los espectros de extinción de las suspensiones acuosas de las partículas CB consideradas aquí cubren todo el rango visible (figura 2A), presumiblemente debido a un continuo de estados electrónicos en el carbono amorfo. El ligero aumento de la extinción hacia longitudes de onda más cortas para las dos partículas más pequeñas (ufPL y ufP90) probablemente se deba a una mayor dispersión de la luz.

Sin embargo, los gráficos bidimensionales de emisión de excitación de fotones únicos (figura 2B) de ufPL (gráfico similar para fCB: figura 26) muestran solo una emisión débil; observe en comparación la línea débil de Raman (flecha roja) del agua, el medio de suspensión.

Sin embargo, las gráficas bidimensionales de emisión de excitación de fotones únicos (figura 2B) de ufPL (gráfica similar para fCB: figura 26) muestran solo una emisión débil; observe en comparación la línea débil de Raman (flecha roja) del agua, el medio de suspensión.

A diferencia de la excitación de un solo fotón, la iluminación con luz infrarroja cercana pulsada de femtosegundo (810 nm, 150 fs, 80 MHz) genera una fuerte emisión de luz blanca sin características que extienda todo el espectro visible (Figuras 3A y B). Esta observación se realizó para los cuatro tipos de suspensiones acuosas de CB usadas en este estudio e incluso para partículas secas (Figura 28). Esta emisión WL es independiente de la longitud de onda de iluminación dentro del rango de 780 a 900 nm para una potencia media constante de 8 mW en la muestra (Figura 3B, Figura 29).

Mientras PL como se ve en la figura 2B no puede explicar la fuerte emisión de WL observada bajo iluminación de femtosegundos (Figuras 1C, 3A y B), las investigaciones con resolución temporal son indicativas. Usando equipo de fotón único correlacionado con el tiempo, se observa una naturaleza instantánea de la radiación WL cuando se observa la escala de tiempo de picosegundos (Figura 30). También en experimentos de conversión ascendente de femtosegundos con una resolución temporal más alta, se observa que la señal emitida de las partículas CB es

instantánea (figura 3C). En nota adicional, la iluminación con pulsos de 7 ps da como resultado una intensidad de luminiscencia fuertemente reducida (figura 31). Por lo tanto, la emisión de WL de las partículas de CB suspendidas solo se activa de manera eficiente mediante la iluminación de femtosegundos con campos electromagnéticos de pico alto y una vez que cesa el pulso de iluminación de femtosegundos, la emisión de WL termina inmediatamente.

La naturaleza instantánea de la señal observada confirma que no estamos tratando con incandescencia a pesar de usar iluminación láser con fluencias de aproximadamente 0.05 J/cm^2 a una energía de pulso de 0.1 nJ, similar a los experimentos previos.

La emisión instantánea observada de WL tampoco está relacionada con los cambios del índice de refracción local en el entorno de nanopartículas de CB al llegar el pulso. Podemos confirmar que también la emisión WL de CB muestra una respuesta no lineal de segundo orden con respecto a la potencia incidente (figura 32).

Como resultado de la generación visible de WL por partículas de negro de carbono bajo iluminación infrarroja cercana pulsada de femtosegundos, la señal de las partículas se puede combinar fácilmente con diversos fluoróforos convencionales que mejoran el contraste utilizados para visualizar características biológicas. Como se muestra en la figura 4, el WL emitido puede sondearse a diferentes longitudes de onda con potencias láser compatibles con imágenes de células vitales. Por lo tanto, la detección de CB se puede combinar con imágenes simultáneas de compartimentos celulares teñidos por diferentes fluoróforos con etiqueta de color. Esta detección simultánea permite la localización inequívoca de las partículas dentro de las células y coloca la ubicación del CB directamente en su contexto biológico.

Para ilustrar aún más la versatilidad de la técnica en un entorno biológico, se realizó un estudio de colocalización del citoesqueleto de tubulina de fibroblastos de pulmón MRC-5 y partículas de carbono inmersas (Figura 5). Las imágenes muestran un claro impacto de CCB en la arquitectura del citoesqueleto de tubulina de las células para una incubación que excede las cuatro horas a 37°C . Más específicamente, la red de citoesqueleto de soporte evoluciona de la estructura similar a la fibra comúnmente observada a un difuso parcial y configuración holey. La alteración del citoesqueleto también se refleja en la morfología general de las células. Su apariencia cambió de la morfología normal bipolar y estirada a una más pequeña y de forma más irregular, lo cual es una indicación de apoptosis (estos hallazgos biológicos también son ciertos para las otras partículas CB más pequeñas, para un ejemplo adicional con ufp90, figura 33). Estas imágenes no solo señalan la versatilidad en entornos biológicos, sino que también indican de inmediato la relevancia social y la importancia de esta técnica de detección. La información ventajosa potencial que surge de esta detección simultánea comprende las correlaciones que se pueden hacer entre la ubicación de las partículas y la estructura celular alterada (por ejemplo, citoesqueleto y adherencias focales). Esto hace que la emisión de WL observada sea un mecanismo de detección sin etiquetas extremadamente interesante para la investigación biomédica, incluida la toxicología y la epidemiología.

Para concluir, la iluminación pulsada de femtosegundos de CB seguida de la detección de WL emitida es un enfoque directo sin la necesidad de un pretratamiento de muestra particular y que puede implementarse fácilmente en experimentos de imágenes de múltiples fotones. La naturaleza de la señal la hace muy versátil en términos de elección de fluoróforos adicionales. La facilidad del enfoque informado amplía la aplicabilidad potencial en el campo de rápido crecimiento de la nanotecnología. Además, avanzará en los estudios epidemiológicos y toxicológicos, ya que esta es la primera vez que se describe una técnica para detectar directamente el negro de carbono en un entorno biológico sin ningún tratamiento o etiquetado adicional requerido. Anticipamos que esta tecnología permitirá detectar tejidos humanos y fluidos corporales para detectar la presencia de CB debido al enfoque multifotón que resulta en un seccionamiento 3D inherente y altas profundidades de imagen. Esto eventualmente puede conducir a información valiosa sobre, por ejemplo, la absorción y eliminación real de partículas CB por el cuerpo humano.

La figura 6 proporciona una vista en perspectiva que explica una realización de un aparato para analizar partículas carbonosas en fluidos, células o tejidos de medios biológicos y portadores de origen no biológico de acuerdo con la presente divulgación. En la Figura 6, un chasis para acomodar componentes del aparato para analizar partículas carbonosas en fluidos y tejidos se omite en parte para facilitar una buena comprensión.

Las figuras 7A y 7B son dibujos que muestran un esquema de una composición funcional de la sección 2 de distribución de muestras de fluido y parte de la sección 3 de detección óptica. En la Figura 7A, una mesa 21 de rejilla transfiere una rejilla de muestra (soporte de tubo de ensayo para fluidos) 22. La muestra de fluido está contenida en un tubo 24 de ensayo desechable que está especialmente diseñado para adaptarse al sistema y tiene una etiqueta 25 de código de barras que el sistema puede escanear automáticamente para el reconocimiento de ID (no mostrada). Después de agitar, la muestra es succionada por una bomba de jeringa 26 usando un tubo de succión y se distribuye a la sección 28 alícuota de muestra líquida por un tubo 27 microfluídico dentro del recipiente 284 de muestra líquida. La sección 28 de distribución de muestra líquida en la presente realización está compuesta de diferentes recipientes intercambiables que contienen fluido de revestimiento (Sh) 281, fluido de enjuague (Ri) 282, solución de calibración (C) 283 y la alícuota de muestra líquida (S) a analizar 284, y una bomba 285, y válvulas 286 de control de flujo. La figura 7B muestra adicionalmente la recogida 213 de residuos que permite el enjuague del recipiente de muestra y el tubo. La sección 28 de distribución de muestra introduce partes alícuotas de muestra líquida cuantificada a través de un tubo 287 microfluídico en la sección 3 de detección óptica. La muestra líquida crea una corriente fina que se

envuelve mediante un alimentador de solución de revestimiento de temperatura controlada 288 en una celda 311 de flujo de revestimiento y la luz láser se irradia a través de un objetivo 33. Estas operaciones se llevan a cabo automáticamente accionando unidades de accionamiento y válvulas (no mostradas), controladas por sensores de flujo y válvulas (no mostradas), y controladas por un microordenador 55 (aparato de control), que se describirá a continuación.

La figura 7C es un dibujo que explica el mecanismo de cuantificación de la muestra de fluido del aparato para analizar partículas carbonosas relacionadas con la presente realización. Bajo el control del microordenador 55, se emplea una válvula 286 de muestreo, que se usa regularmente, como mecanismo de cuantificación para distribuir una cantidad predeterminada de muestra de fluido al recipiente (S) 284 de muestra. Esta válvula 286 de muestreo incluye dos elementos fijos en forma de disco y un elemento móvil que está empujado por los elementos fijos, y el elemento móvil es girado por un motor (no mostrado). La válvula 286 de muestreo está equipada con dos discos 286a, 286b superpuestos entre sí. Se forma una ruta de flujo dentro de los discos para la circulación de la muestra, la ruta de flujo se aísla cuando un disco 286b se gira alrededor del eje central del mismo, cuantificando así la muestra. El recipiente 284 de muestra líquida es calentado por los calentadores 289a y 289b, cada uno de los cuales compone una sección de regulación de temperatura. El control de la temperatura es importante para controlar la viscosidad y, por lo tanto, la velocidad del flujo de la muestra líquida. Dependiendo del tipo de fluido, la temperatura de los calentadores puede controlarse mediante el microordenador 55 mediante control de encendido-apagado, en función de los resultados de las mediciones así obtenidas. Este diseño es idéntico para los otros recipientes, a saber, el recipiente (C) 283 de solución de calibración, el recipiente (Ri) 282 de fluido de enjuague y el recipiente (Sh) 281 de fluido de revestimiento.

La figura 8 es un dibujo que muestra una composición de la sección 3 de detección óptica. Un divisor 32 de haz refleja la luz láser irradiada desde un láser 34 pulsado de femtosegundo a través del objetivo 33 en el soporte 31 de la muestra. El soporte 31 de muestra es una celda 311 de flujo de revestimiento a través de la cual se dirigirán los fluidos o un cubreobjetos 312 de microscopio ópticamente transparente que puede soportar polvos, células y tejidos carbonosos que han sido expuestos a partículas carbonosas. Un lente 35 colector enfoca la luz emitida hacia adelante de partículas carbonosas sobre un detector 36, que puede actuar como un elemento receptor de luz hacia adelante, que contiene un filtro de paso de banda 37 que bloquea la luz láser. Además, otro lente 38 colector enfoca la luz hacia atrás a través de un filtro de paso de banda que bloquea la luz láser en un detector 39, que actúa como un elemento receptor de luz hacia atrás. Estas señales ópticas se originan a partir de las partículas carbonosas. El detector 36 y el detector 39 convierten las señales ópticas en señales eléctricas y generan cada uno una señal de luz hacia adelante y una señal de luz hacia atrás, respectivamente. Después de ser amplificados por un preamplificador (no mostrado), estas salidas están sujetas al siguiente procesamiento. En cuanto a la fuente de láser 34, un láser que genera pulsos con una duración de pulso lo suficientemente corta como para desencadenar una respuesta instantánea de partículas carbonosas. Se utilizará un rayo láser estacionario al detectar y analizar partículas carbonosas en el aire y fluidos de medios biológicos o portadores de origen no biológico, de lo contrario al detectar y analizar estas partículas en células y tejidos de medios biológicos o portadores de origen no biológico se utilizará el rayo láser de exploración o la etapa de exploración que sostiene el portaobjetos de la cubierta del microscopio. Es preferible emplear una tasa de repetición del orden de MHz. La longitud de onda de los pulsos puede variar de 750 a 950 nm o de 700 a 1200 nm.

La figura 9 es un diagrama de bloques que muestra una composición completa del aparato U para detectar y analizar partículas carbonosas en fluidos, células y tejidos de medios biológicos o portadores de origen no biológico. El aparato U para detectar y analizar partículas carbonosas en el aire, fluidos, células y tejidos de medios biológicos y portadores de origen no biológico incluye la sección 2 de distribución de muestras de fluidos mencionada anteriormente y la sección 3 de detección óptica, un circuito 51 de procesamiento de señal analógica para ejecutar el procesamiento de amplificación y filtro de la salida de la sección 3 de detección óptica para aquellas señales de detector que están siendo amplificadas por el preamplificador, un convertidor 52 A/D para convertir la salida del circuito 51 de procesamiento de señal analógica en una señal digital, un circuito 53 de procesamiento de señal digital para ejecutar un procesamiento de forma de onda predeterminado para señales digitales, memoria 54 conectada al circuito 53 de procesamiento de señal digital, el microordenador 55 conectado al circuito 51 de procesamiento de señal analógica y al circuito 53 de procesamiento de señal digital, y una conexión de transferencia de datos (por ejemplo, Conexión LAN, USB o Wifi) 56 conectada al microordenador 55. El ordenador personal 6 (sección de análisis) proporcionada en el exterior está conectada a través de la transferencia 56 de datos al aparato U para detectar partículas carbonosas en fluidos, células y tejidos de medios biológicos y portadores de origen no biológico, y análisis de datos adquiridos por el aparato. El circuito 51 de procesamiento de señal analógica, el convertidor 52 A/D, el circuito 53 de procesamiento de señal digital y la memoria 54 componen un circuito 5 de procesamiento de señal para las señales eléctricas que salen por la sección 3 de detección óptica.

La figura 10 muestra una composición de la sección de batería y controlador de temperatura del aparato para detectar y analizar partículas carbonosas. El microordenador 55 controla la fuente 41 de alimentación del aparato con retroalimentación al ordenador 6 y el bloque 42 de batería de respaldo salvaguarda para evitar la pérdida de datos y enviar una señal de retroalimentación al aparato U para pasar al modo de espera o apagado. La unidad 43 de control de enfriamiento termoelectrónico de las unidades 36 y 39 del detector para reducir el ruido y del láser 34 para garantizar un rayo láser estable.

La figura 11 es un diagrama de flujo (primera mitad) que muestra los procedimientos de análisis que utilizan el aparato para detectar y analizar partículas en el aire, fluidos, células y tejidos de medios biológicos y portadores de origen no biológico relacionados con una realización de acuerdo con la presente divulgación

- 5 La figura 12 es un diagrama de flujo (segunda mitad) que muestra los procedimientos de análisis que usan el aparato para detectar y analizar partículas en fluidos, células y tejidos de medios biológicos y portadores de origen no biológico relacionados con una realización de acuerdo con la presente divulgación;

- 10 A continuación, haciendo referencia a los diagramas de flujo que se muestran en la figura 11 y la figura 12, se explicarán los procedimientos de análisis que utilizan el aparato para detectar y analizar partículas carbonosas relacionadas con una realización de acuerdo con la presente invención.

- 15 Primero, la información de la muestra, como el número de muestra, la información del paciente, como el nombre, la edad, el género y otras especialidades asociadas con el número de muestra, y los elementos de medición se pueden insertar para un lote de muestras (Paso S1). Luego se da una instrucción de ejecución de medición por medios de entrada, como un teclado o un ratón del ordenador personal 6 (Paso S2). Al recibir esta instrucción, se realiza un procedimiento de calibración automatizado que incluye el enjuague de la tubería con fluido de enjuague (Paso S3), la calibración con fluido de calibración (Paso S4) y el enjuague nuevamente de la tubería con fluido de enjuague (Paso S5). Durante la calibración, se proporciona retroalimentación a la sección 3 de detección óptica, y las configuraciones se ajustan en consecuencia.

Para muestras de fluidos, se aplica el siguiente procedimiento:

- 25 Después de la calibración, la rejilla de muestra 22 en la que se establecen tubos de ensayo que contienen cada uno una muestra líquida es transferida 23 por la mesa 21 de rejilla a una posición de succión predeterminada (Paso S6). Se está leyendo el tubo 24 de ensayo en el que se pega un código de barras 25 impreso en la etiqueta ID (Paso S7) 24. Entonces se conoce el número de muestra, que luego se verifica con la información de muestra adquirida en el paso S1, y se pueden identificar los ítems de medición de la muestra. Luego, el tubo 26 de succión baja, se inserta un borde frontal del tubo 26 de succión se inserta en la muestra en el tubo 24 de ensayo, y la muestra se aspira y descarga 30 ligeramente de manera repetida en este estado para que la muestra se pueda agitar (Paso S8). Después de agitarse, una cantidad predeterminada de la muestra se aspira en la sección de alícuota de muestra líquida 28 y se dispensa a través del tubo 27 microfluídico en el recipiente 284 de muestra líquida por la válvula 286 de muestreo (Paso S9). El recipiente 284 de muestra líquida se calienta mediante los calentadores 289a y 289b a una temperatura predeterminada, y la agitación de la muestra se lleva a cabo mediante un agitador de tipo hélice (no mostrado).
- 35 Después de esto, una solución de revestimiento del recipiente 281 de fluido de revestimiento se envía a la celda 311 de flujo de revestimiento de la sección 3 de detección óptica (Paso S10), la muestra de fluido para la medición de partículas carbonosas se introduce luego en la sección 3 de detección óptica, y se forma una corriente fina (flujo de revestimiento) envuelto por la solución de revestimiento en la celda de flujo de revestimiento 311 (Paso S11). Una vez completada la medición (A), la muestra de líquido se recoge en un contenedor de residuos después de la medición 40 (Paso S12) y el tubo y el recipiente de muestra de líquido 284 se enjuagan usando líquido de enjuague del recipiente de líquido de enjuague 282 (Paso S13).

- 45 Al medir aire, células y tejidos de medios biológicos y portadores de origen no biológico, se omiten los pasos S6 hasta el paso S13 inclusive. Esto significa que después de los pasos de calibración (Paso S3-Paso S5) las muestras son irradiadas directamente por el rayo láser (Paso S14). En el caso de las muestras líquidas, el rayo láser del láser 34 de femtosegundo se irradia a la celda 311 de flujo de vaina (Etapa S14).

- Los detectores 36 y 39, respectivamente, convierten la luz delantera y hacia atrás de las partículas carbonosas generadas por la irradiación pulsada del rayo láser, convertidas en señales eléctricas, y son emitidas por la sección 3 50 de detección óptica como una señal de luz hacia adelante y una señal de luz hacia atrás (Paso S15). Estas salidas son amplificadas por el preamplificador (Paso S16) y convertidas a señales digitales en el circuito de procesamiento de señales 5 (ver Figura 9) y, al mismo tiempo, sometidas al procesamiento de forma de onda predeterminado (Paso S17), y se transmiten al ordenador personal 6 mediante transferencia 56 de datos. Luego, se generan datos brutos de las partículas carbonosas en el ordenador personal 6 (Paso S18) y al mismo tiempo, se generan diagramas de 55 intensidad y tamaño (muestras de fluidos) o imágenes (células y tejidos) en base a los datos (Paso S19). Además, el número de partículas carbonosas se cuenta para cada conjunto de datos (Paso S21) en función del análisis del algoritmo realizado (Paso S20). Los resultados de las mediciones obtenidas como se mencionó anteriormente se muestran en una pantalla que es un medio de visualización del ordenador personal 6 (Paso S22).

- 60 La figura 2A ilustra la relación entre la longitud de onda de absorción y la absorbancia para diferentes partículas carbonosas ejemplares en solución. Como ejemplos se utilizaron cuatro tipos de partículas carbonosas (CB): nanopolvo ultrafino de negro de carbono (ufPL; PlasmaChem GmbH, Alemania), Printex 90 ultrafino (ufP90; Orion Engineered Carbons, Alemania), nanopolvo conductor de negro de carbono (CCB; US Research Nanomaterials, EE. UU.) y nanopolvo de carbono fino mesoporoso (fCB; Sigma-Aldrich, Bélgica). Los diámetros aerodinámicos medios 65 proporcionados por los fabricantes fueron 13, 14, 150 y 300 nm para ufPL, ufP90, CCB y fCB, respectivamente. Se prepararon suspensiones acuosas (2 mg/ml), se ultrasonificaron durante 30 minutos y se almacenaron a 4°C en la

oscuridad hasta su uso posterior. Inmediatamente antes de su uso, las suspensiones originales se ultrasonificaron durante 20 minutos antes de la dilución en agua, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Life Technologies, Bélgica) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS; Biochrom AG, Alemania), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Los espectros de absorción de las soluciones CB se midieron con un espectrómetro Lambda 950 UV/Vis/NIR (Perkin Elmer, Waltham, EE. UU.) Doble haz, doble monocromador, espectrofotómetro UV/Vis/NIR de registro de relación. Las suspensiones se prepararon como se describe y se midieron en una cubeta de cuarzo (longitud del camino óptico de 1 cm) inmediatamente después de la preparación para minimizar la sedimentación. Se registraron escaneos individuales en el rango de longitud de onda espectral visible entre 400 y 800 nm con una velocidad de escaneo de 0.25 nm/s y un ancho de hendidura de 5 nm. Los espectros de extinción de las suspensiones acuosas de las partículas CB consideradas aquí cubren todo el rango visible, presumiblemente mueren a un continuo de estados electrónicos en el carbono amorfo. El ligero aumento de la extinción hacia longitudes de onda más bajas para las dos partículas más pequeñas (ufPL y ufP90) probablemente se deba a una mayor dispersión de la luz.

La figura 30 muestra la respuesta temporal de partículas CB y/o BC secadas sobre vidrio y en suspensión acuosa medida por tiempo de conteo de fotones individuales correlacionado con el tiempo. También se muestra la función de respuesta del instrumento (IRF). Después de la iluminación de femtosegundos (810 nm, 80 MHz, 5 mW) de los CB suspendidos en agua ultrapura o secados en un vidrio de cobertura, la respuesta temporal de la señal emitida se detectó usando un tubo fotomultiplicador GaAsP (PMT; 7422, Hamamatsu, Alemania) después del filtrado espectral utilizando un espejo dicróico KP 650, un filtro de paso corto KP 685 y un filtro de paso de banda (BP) 450-650. El PMT estaba conectado a una tarjeta SPC830 (Becker y Hickl, Alemania) que estaba sincronizada con el tren de pulsos del láser. Las grabaciones de las imágenes de 256×256 píxeles con un tamaño de píxel de 0.11 µm se realizaron utilizando un tiempo de permanencia de píxeles de 6.4 µs. Este resultado experimental muestra la naturaleza instantánea de la señal emitida por las partículas carbonosas.

La figura 3A es una ilustración gráfica de espectros de emisión normalizados de suspensiones acuosas de partículas CB y/o BC utilizando iluminación láser de femtosegundos con duración de pulso <200 femtosegundos. Las suspensiones CB estaban contenidas en cámaras ópticas fabricadas por dos diapositivas de cubierta de vidrio unidas por cinta adhesiva de doble cara (8153LE, 3M, Bélgica) con un orificio central perforado de 5 mm. Estas suspensiones de CB o partículas de CB secadas sobre un vidrio de cubierta (se excitaron con un láser de titanio- zafiro de femtosegundo convencional (810 nm, 150 fs, 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.). El poder de iluminación se ajustó a 8 mW después de un Objetivo aéreo 60×/0.95 (CFI Plan Apo Lambda 60×/0.95, Nikon, Japón). Un filtro dicróico de paso corto de 750 nm estaba separando la emisión visible de la iluminación infrarroja cercana. La luz emitida se enfocó en un orificio y luego se fotografió en un espectrógrafo con una cámara EM-CCD (ImagEM Enhanced C9100-13, Hamamatsu, Japón). Un filtro adicional de paso corto bloqueó cualquier luz láser fundamental. Los tiempos de integración de 45 s fueron suficientes para generar espectros con una alta relación de señal a ruido (>100). A partir de estos resultados experimentales, se puede ver que la iluminación de partículas carbonosas con luz pulsada de femtosegundo genera una emisión de luz fuerte y sin características que se extiende sobre una gran parte del espectro.

La figura 3B es una ilustración gráfica de los espectros de emisión normalizados de una suspensión de partículas CB y/o BC registrada a diferentes longitudes de onda utilizando un láser de femtosegundos con una duración de pulso <200 femtosegundos en el foco de un objetivo con apertura numérica de 0.9. Este resultado experimental muestra que la emisión de las partículas carbonosas es independiente de la longitud de onda de iluminación dentro del rango probado de 780 a 900 nm para una potencia constante de 8 mW en la muestra.

La figura 13 es un resultado ejemplar del agua ultrapura enriquecida linealmente con partículas CB y/o BC y medida utilizando el método inventado presentado para medir partículas carbonosas. Las soluciones se prepararon usando los mismos pasos de ultrasonificación que se describió anteriormente y la muestra seca se preparó secando al aire una gota de CCB en agua ultrapura sobre un vidrio de cubierta. Las imágenes se recogieron utilizando un Zeiss LSM510 META NLO (Carl Zeiss) montado en un Axiovert 200 M equipado con un láser pulsado de femtosegundo (MaiTai, Spectra Physics, 150 fs, CA, EE. UU.) Sintonizado a una longitud de onda central de 810 nm con un 5 o 10 mW de potencia radiante en la posición de la muestra y utilizando un objetivo de inmersión en agua 40×/1.1 (LD C-Apochromat 40×/1.1 W Korr UV-Vis-IR, Carl Zeiss). Todas las imágenes se tomaron 300 µm por encima del cristal de cubierta para reducir la variación entre las muestras y en total se obtuvieron 10 imágenes para su análisis. Para contar el número de partículas carbonosas en estas imágenes, se utilizó un algoritmo simple de búsqueda de picos en Matlab (Matlab 2010, MathWorks) que cuenta los píxeles conectados por encima de un valor umbral. Se eligió un valor umbral de 15% más bajo que el valor de intensidad más alto que dio valores altamente reproducibles. Como una imagen refleja solo la cantidad de partículas en un volumen específico, esto se recalculó a una cantidad total de partículas detectadas por ml. De este resultado queda claro que existe una relación lineal entre la concentración añadida de partículas carbonosas en agua ultrapura y la cantidad de partículas detectadas por ml de agua ultrapura. Los datos (N = 3) se trazan linealmente ($R^2 = 0.99$).

La figura 14 es un resultado ejemplar de la formación de imágenes de partículas CB y/o BC (600 µg/ml) en agua ultrapura, etanol y glicerol a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barras de escala: 15 µm. Banda de emisión: 450-650 nm. Las partículas de CCB se dispersaron a una concentración de 600 µg/ml en agua ultrapura, etanol (Etanol absoluto, VWR Chemicals,

Bélgica), glicerol (Glicerol BioXtra $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Bélgica) y aceite de microscopio (ImmersolTM 518 F, Carl Zeiss, Alemania). Las soluciones se prepararon utilizando los mismos pasos de ultrasonificación descritos anteriormente. Las imágenes se recogieron utilizando un Zeiss LSM510 META NLO (Carl Zeiss, Alemania) montado en un Axiovert 200 M equipado con un láser pulsado de femtosegundo (810 nm, 150 fs, 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.) Sintonizado a una longitud de onda central de 810 nm con una potencia radiante de 5 o 10 mW en la posición de la muestra y utilizando un objetivo de inmersión en agua de 40 $\times$ /1.1 (LD C-Apochromat 40 $\times$ /1.1 W Korr UV-Vis-IR, Carl Zeiss). Las imágenes 1024 $\times$ 1024 resultantes con un tamaño de píxel de 0.22 μ m se registraron con un tiempo de permanencia de píxel de 1.6 μ s a temperatura ambiente. De estos resultados puede verse que, dependiendo del medio de suspensión, la potencia del láser debe ajustarse para generar una intensidad de emisión similar: en glicerol y aceite de inmersión, la potencia de iluminación era aproximadamente el doble que la del experimento en etanol o agua. Observe la mancha horizontal de las partículas carbonosas (tiempo de permanencia de píxeles de 1.60 μ s, tamaño de píxeles de 220 nm). Este fenómeno se observa en todas las combinaciones de velocidades de escaneo y acercamientos (datos no mostrados), lo que sugiere la susceptibilidad de las partículas a la captura óptica en estas condiciones. Esta hipótesis es respaldada además por la iluminación de partículas CB en polidimetilsiloxano (figura 19) donde no se observan manchas horizontales.

La figura 15 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar partículas CB y/o BC en la orina del fluido corporal a temperatura ambiente [22°C, ver más abajo] tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 50 μ m. Banda de emisión: 450-650 nm. Las muestras de orina se recogieron utilizando frascos de muestra libres de metales designados (Yvsolab, Bélgica) y se colocaron a 4°C hasta el almacenamiento a largo plazo a -80°C. Un objetivo de inmersión en agua 40 $\times$ /1.1 (LD C-Apochromat 40 $\times$ /1.1 W Korr UV-Vis-IR, Carl Zeiss) se usó y el láser se sintonizó a una longitud de onda central de 810 nm con una potencia radiante de ~ 9.7 mW en la posición de la muestra. La emisión de partículas carbonáceas se detectó a través de la detección de fotomultiplicadores analógicos en configuración epi en modo no desescaneado después de que la señal pasara a través de un filtro de paso de banda de 400-410 nm. Las imágenes resultantes tenían una resolución de 512 $\times$ 512 píxeles, un tamaño de píxel de 0.44 μ m y un tiempo de permanencia de 3.2 μ s. Todos los datos se registraron a temperatura ambiente (22°C). De estos datos se puede concluir que es posible medir bajas concentraciones de partículas carbonosas en fluidos y más específicas en fluidos corporales.

La figura 16 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar partículas CB y/o BC en polidimetilsiloxano a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 50 μ m. Banda de emisión: 450-650 nm. Las partículas carbonosas se dispersaron a una concentración de 600 μ g/ml en una mezcla de relación de peso 10:1 de polímero base de polidimetilsiloxano (PDMS) y agente de curado (Dow Corning, Alemania) desgasificado a 0.55 bar y curado durante 30 minutos a 70°C. Las soluciones se prepararon utilizando los mismos pasos de ultrasonificación descritos anteriormente. Las imágenes se recogieron utilizando un Zeiss LSM510 META NLO (Carl Zeiss, Alemania) montado en un Axiovert 200 M equipado con un láser pulsado de femtosegundo (810 nm, 150 fs, 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.) Sintonizado a una longitud de onda central de 810 nm con una potencia radiante de 5 mW en la posición de la muestra y utilizando un objetivo de inmersión en agua 40 $\times$ /1.1 (LD C-Apochromat 40 $\times$ /1.1 W Korr UV-Vis-IR, Carl Zeiss). Las imágenes 1024 $\times$ 1024 resultantes con un tamaño de píxel de 0.22 μ m se registraron con un tiempo de permanencia de píxel de 1.6 μ s a temperatura ambiente. Se puede ver que en este polímero no se observa atrapamiento óptico, sino que es posible detectar partículas carbonosas y fotografiarlas.

La figura 17 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar compartimentos celulares de células fijas de fibroblastos de pulmón humano (línea celular MRC-5) que habían envuelto partículas CB y/o BC cuando se expusieron a partículas de 5 μ g/cm² a 37°C antes de fotografiarlas. La emisión de las partículas carbonosas se sondeó a 400-410 nm tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 20 μ m. Se mantuvieron células de fibroblastos de pulmón fetal humano (línea celular MRC-5, ATCC CCL-171, LGC Standards, Francia) (37°C, 5% de CO₂) en Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Cuando se alcanzó una confluencia del 80-90%, las células se subcultivaron rutinariamente. Las células para la obtención de imágenes se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 10,000 células/pocillo y se incubaron durante la noche para permitir la adhesión celular. Después de lavar tres veces con PBS, las células se trataron con una concentración de diferentes 5 μ g/cm² de partículas carbonosas. Las células sin CB se utilizaron como controles. Después de la exposición durante 4 h, las células se lavaron tres veces con IMDM y se fijaron usando paraformaldehído al 4% que contenía sacarosa al 4% en PBS durante 20 min. La permeabilización y el bloqueo se realizaron durante 2 h utilizando Triton X-100 al 0.3%, durante 30 minutos, seguido de un bloqueo de 1 h con albúmina de suero bovino al 12% (BSA, Sigma-Aldrich, Bélgica) y suero de cabra al 10% (Merck Millipore, Bélgica) en PBS que contiene 0.3 M de glicina (VWR Chemicals, Bélgica) y 5% de sacarosa. Los anticuerpos se diluyeron en un tampón de bloqueo que consiste en BSA al 1% y Tritón X-100 al 0.1% en PBS. Los anticuerpos primarios fueron anti- α -tubulina de ratón monoclonal (1:1,000 durante 1 hora a temperatura ambiente, Sigma-Aldrich, Bélgica), vimentina antihumana de rata monoclonal (10 μ g/ml durante 3 horas a temperatura ambiente, Bio-Techne, Reino Unido), y anti-paxilina de conejo monoclonal (1:100 durante la noche a 4°C, Abcam, Reino Unido). Los anticuerpos secundarios fueron Alexa Fluor 488 antirratón de burro, Alexa Fluor 555 antirata de cabra y Alexa Fluor 647 anticonejo de cabra (1:250, 1 h, Life Technologies, Bélgica). Además, Alexa Fluor 647 de faloidina de teñir actina (1:40, 1 h, Life Technologies, Bélgica). Todos los lavados se realizaron tres veces con PBS durante al menos 5 min. Antes de la imagen confocal, se aspiraban todos los pocillos y se agregaban 200 μ l de

Immu-Mount (Thermo Scientific Shandon™ Immu-Mount™, Thermo Fisher Scientific, Alemania). Todas las imágenes se recogieron a temperatura ambiente utilizando un cabezal de escaneo Zeiss LSM510 META NLO montado en un microscopio de escaneo láser invertido (Zeiss Axiovert 200 M, Alemania) y un objetivo de inmersión en agua 40×/1.1. Las partículas CB se iluminaron con un tren de pulsos láser de femtosegundos y una potencia láser promedio de 4 mW en la muestra (810 nm, 150 fs, 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.). Se observó la emisión de las partículas en el modo no desescaneado después de la separación espectral y el filtrado de la señal y se usó un filtro BP (paso de banda) de 400-410 nm para filtrar adicionalmente la luz de emisión. En el modo desescaneado, la señal emitida se detectó con un BP 650-710. El agujero se abrió por completo. Para evitar diafonía en la emisión de luz blanca de las partículas carbonosas cuando se forman imágenes de estructuras marcadas con fluoróforos, es necesaria una imagen posterior. Para obtener imágenes del citoesqueleto de tubulina de las células, el microscopio se acopló a un láser de iones de argón refrigerado por aire de 30 mW (LASOS Lasertechnik GmbH, Alemania) que emitía a 488 nm (~3 µW de potencia radiante máxima en la muestra). El filtro de paso de banda 500-530 se usó para filtrar la señal de emisión. Para obtener imágenes tanto del citoesqueleto de actina como de la célula completa, se realizó la excitación a 543 nm utilizando un láser de helio neón de 5 mW (LASOS Lasertechnik GmbH, Alemania, ~3 µW de potencia radiante máxima en la muestra). El filtro de paso de banda 565-615 se usó para filtrar la señal de emisión. Las imágenes de 1024×1024 resultantes con un tamaño de píxel de 0.06 µm se registraron utilizando un tiempo de permanencia de píxel de 14.2 µs. Se usó un tamaño de agujero fijo de 100 µm. Las imágenes se capturaron con el software AIM 4.2 (Carl Zeiss, Alemania) y se procesaron con el paquete de procesamiento de imágenes Fiji (ImageJ v1.47, software de código abierto, <http://fiji.sc/Fiji>). Como resultado de la amplia emisión de partículas carbonosas bajo iluminación pulsada de femtosegundos, la señal de las partículas se puede combinar fácilmente con diversos fluoróforos convencionales que mejoran el contraste utilizados para visualizar características biológicas. Esta detección simultánea permite la localización inequívoca de las partículas dentro de las células y coloca la ubicación del CB directamente en su contexto biológico.

La figura 18 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar células de fibroblastos de pulmón humano vivo (línea celular MRC-5) expuestas a partículas de 5 µg/cm² a 37°C. La emisión de las partículas CB y/o BC se ha sondeado a 400-410 nm tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 20 µm. Este resultado muestra que, además de las células fijas, es posible obtener imágenes de células vivas que engloban partículas carbonosas.

La figura 19 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar partículas CB y/o BC en la placenta de tejido biológico a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 25 µm. Banda de emisión: 450-650 nm. Esto muestra que es posible detectar partículas carbonosas captadas por tejidos biológicos y tejidos humanos más precisos.

La figura 20 es un resultado ejemplar obtenido mediante la formación de imágenes de partículas CB y/o BC en las hojas de hiedra de tejido vegetal biológico a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 50 µm. Banda de emisión: 450-650 nm. Esto muestra que es posible detectar partículas carbonosas captadas por tejidos biológicos y tejidos vegetales más precisos.

La figura 21 es una representación del diagrama de flujo de un protocolo experimental optimizado para la detección de BC en orina. Cada muestra de orina se divide en partes alícuotas a 200 µL/pocillo en µ-láminas de 8 pozos Ibidi y las imágenes se toman 300 µm por encima del vidrio de cubierta de la placa del pocillo (A). Las muestras se iluminan usando un láser pulsado de dos fotones femtosegundo sintonizado a una longitud de onda central de 810 nm (~9.7 mW de potencia radiante en la posición de la muestra) y la luz blanca generada por las partículas BC presentes naturalmente en la orina se detecta a través de detección de fotomultiplicador análogo en configuración epi en modo no desescaneado utilizando un objetivo de inmersión en agua 40×/1.1 a temperatura ambiente (B). Se toman 10 imágenes consecutivas en una ubicación idéntica en el mismo pozo. Las imágenes resultantes tienen un campo de visión de 225 × 225 µm² con una resolución de 512×512 píxeles (0.44-0.44 µm² tamaño de píxeles) y un tiempo de permanencia de píxeles de 3.2 µs (C). En total, se obtienen 120 imágenes registrando lapsos de tiempo de 10 cuadros en tres ubicaciones diferentes en cuatro partes alícuotas diferentes de un individuo (ID), lo que resulta en resultados altamente reproducibles (<5% de coeficiente de variación) (D). Para determinar el número de partículas BC en las imágenes, se utilizó un algoritmo de búsqueda de pico que cuenta los píxeles conectados por encima de un valor umbral (15% más bajo que el valor de intensidad más alto) (E). La cantidad promedio de partículas detectadas en los diferentes intervalos de tiempo se normalizó al volumen de la imagen utilizando el volumen focal estimado a partir de la función de dispersión puntual del sistema óptico. Finalmente, el resultado se expresa como el número relativo total, es decir, el número de partículas BC detectadas por mililitro de orina. Todas las imágenes de cada individuo se analizan de esta manera para recuperar una cantidad de partículas BC detectadas por mililitro de muestra de orina (F).

La figura 22 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar partículas BC en la orina de un niño. Los agregados se indican con puntas de flecha y las partículas <300 nm (más pequeñas que un píxel) se indican con flechas. Las partículas BC se visualizaron mediante excitación con láser pulsado de femtosegundo a 810 nm y observación a 400-410 nm. Esto muestra que es posible detectar partículas CB y/o BC en un fluido corporal y más específicamente en la orina.

De acuerdo con una realización, se proporciona un método para detectar la presencia o cuantificación de partículas carbonosas o sus agregados en una muestra o medio portador que comprende el paso de generación de emisiones no relacionadas con incandescencia a partir de partículas carbonosas o sus agregados bajo iluminación con luz pulsada que tiene una duración del pulso lo suficientemente corta como para desencadenar una respuesta de muestra temporal instantánea sin emisión de incandescencia de muestra inducida por calor. En este método, la muestra o el medio portador pueden ser fluidos (por ejemplo, fluido corporal, por ejemplo de un mamífero), células o tejidos u otros entornos complejos de origen biológico o no biológico. Es deseable utilizar una fuente de luz láser de femtosegundo ultrarrápida para iluminar la muestra o el medio portador. Esta luz láser que se enfoca en la muestra puede ser de un suministro de haz estacionario o de escaneo. Es deseable que la fuente de luz láser de femtosegundo ultrarrápida para iluminar la muestra o el medio portador tenga longitudes de onda de 750 a 950 nm o en el rango de 700 a 1200 nm. Particularmente adecuados son duraciones de pulso más cortas que 500 femtosegundos. Es deseable utilizar una fuente de luz láser de femtosegundo ultrarrápida para iluminar la muestra o el medio portador, por lo que la tasa de repetición es superior a 1 MHz y más superior a 80 MHz. También es deseable que la luz de iluminación que se centró en la muestra tenga preferiblemente una potencia media de 4-6 mW o al menos con una potencia media inferior a 20 mW y superior a 2 mW. Estas realizaciones de la invención comprenden ventajosamente que las partículas carbonosas o sus agregados a detectar y/o analizar están en medios portadores a una temperatura por debajo de 90°C, preferiblemente entre 1°C y 80°C y más preferible entre 10°C y 50°C y que el método es adecuado para detectar la presencia o cuantificar partículas carbonosas o sus agregados se utilizan sin etiquetado o ningún pretratamiento y en particular partículas de negro de carbono (CB) y carbono negro (BC) o sus agregados.

Esta invención se puede usar junto con la detección de la luz de emisión con cualquier tipo de fotodetector sin imagen o imagen, como un fotomultiplicador, un diodo de avalancha, una matriz CCD o un diodo suficientemente sensible. Además, esta invención puede usarse junto con la detección de la fuerza de emisión por fotomultiplicador o un microscopio láser, tal como un microscopio de exploración láser o un citómetro de flujo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un aparato para llevar a cabo estos métodos descritos anteriormente, en el que el aparato comprende:

a. Una sección de distribución de muestras de medición configurada para distribuir una muestra de control de líquido y una alícuota predefinida de muestra de líquido;

b. Una sección de detección óptica que comprende:

i. Una fuente de luz configurada para emitir una luz que ilumina la muestra de medición como se especifica aquí arriba,

ii. Un elemento receptor de luz hacia adelante configurado para detectar la luz hacia adelante emitida por la muestra, y configurado además para emitir una señal de salida de luz hacia adelante,

iii. Un elemento receptor de luz hacia atrás configurado para detectar la luz hacia adelante emitida por la muestra, y configurado además para emitir una señal de salida de luz hacia atrás

C. Un ordenador, que comprende una unidad central de procesamiento (CPU), que comprende un programa ejecutable por ordenador, configurado para detectar y analizar partículas carbonosas o sus agregados en fluidos, células y tejidos de origen portador de medios biológicos y no biológicos basados en:

i. Una cantidad de señal de luz hacia adelante detectada derivada de la señal de salida de luz hacia adelante y,

ii. Una cantidad de señal de luz hacia atrás detectada derivada de la señal de salida de luz hacia atrás, en la que, cuando es ejecutada por la CPU, el programa ejecutable del ordenador hace que el ordenador genere un diagrama de intensidad y tamaño o una imagen de las partículas carbonosas detectadas.

Tabla 1. Ajustes Lorencianos de Bandas Raman. Los corchetes indican desviación estándar alrededor de la media, N=3.

ufPL (13 nm)				fCB (500 nm)		
	Posición (cm ⁻¹)	Ancho (cm ⁻¹)	Área	Posición (cm ⁻¹)	Ancho (cm ⁻¹)	Área
Banda D	1326 (10)	288 (59)	54 (16)	1325 (19)	484 (131)	74 (55)
Banda G	1569 (3)	95 (11)	23 (8)	1571 (6)	148 (30)	48 (12)
BSWCNT	1695	65	3	1695	90	13

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los cuatro tipos considerados de partículas de negro de carbono

	Diámetro aerodinámico (nm) ^a	Diámetro hidrodinámico (nm)		Potencial Zeta (mV)	(Media ± DE)
		Agua ultrapura	Medio completo	Solución de KCl	Medio completo
ufPL	13	112	171	-12 ± 1	-17 ± 2
ufP90	14	156	218	+29 ± 6	-22.45 ± 0.01
CCB	150	165	226	-48 ± 2	-24 ± 3
fCB	< 500	387	585	-26 ± 3	-21 ± 6

^aDatos del fabricante

Breve descripción de los dibujos

5

La presente invención se comprenderá más completamente a partir de la descripción detallada que se proporciona a continuación y de los dibujos adjuntos que se proporcionan solo a modo de ilustración y, por lo tanto, no son limitativos de la presente invención y en los que:

10 Figura 1A. Representación esquemática del proceso de iluminación y emisión de partículas CB para el método de detección presentado. Figura. 1B. Imagen TEM de un agregado ufPL. Barra de escala: 300 nm. Figura 1C. Imagen de CCB (600 µg/ml) en agua ultrapura, etanol y glicerol a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 o 10 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barras de escala: 15 µm. Banda de emisión: 450-650 nm.

15

Figura 2A. Espectros de extinción de suspensiones acuosas de CB. Figura 2B. Gráfico de excitación-emisión bidimensional de partículas ufPL en agua bajo excitación de fotón único con un mapa falso en blanco y negro basado en la intensidad de emisión en unidades arbitrarias. La flecha apunta hacia la línea de agua Raman.

20 Figura 3A. Espectros de emisión WL normalizados de suspensiones acuosas de partículas CB usando iluminación láser de femtosegundo de 810 nm (8 mW, 150 fs, 80 MHz). Figura 3B. Espectros de emisión de WL normalizados de suspensiones acuosas de ufP90 registradas a diferentes longitudes de onda de iluminación de femtosegundos (de 780 (1) a 900 nm (7), con un intervalo de 20 nm). Figura 3C. Respuesta temporal de la suspensión acuosa de carbono medida mediante experimentos de conversión ascendente de fotoluminiscencia de femtosegundo. También se muestra la función de respuesta del instrumento, (línea discontinua).

25

Figura 4. Imágenes de compartimentos celulares de células MRC-5 fijas teñidas con fluoróforos de uso común y en combinación con la detección de partículas CCB (4 h de incubación de 5 µg/cm² CCB a 37°C antes de imagen). La emisión de las partículas carbonosas se puede sondear a diferentes longitudes de onda, mostradas aquí (figura 4A) 400-410 nm en el modo no desescaneado y (figura 4B) 650-710 nm en modo desescaneado (potencia láser promedio de 4 mW en la etapa). De izquierda a derecha: partículas CCB, citoesqueleto de tubulina (Ex/Em 495/519 nm, potencia radiante ~3 µW en la muestra), vimentina, que es una proteína de filamento intermedio del citoesqueleto (Ex/Em 555/565 nm, potencia radiante ~3 µW en la muestra), paxilina expresada en adherencias focales (Ex/Em 650/665 nm, potencia radiante ~3 µW en la muestra) e imagen superpuesta. Barras de escala: 25 µm.

35

Figura 5. Citoesqueleto de tubulina (verde, Ex/Em 495/519 nm, potencia radiante ~3 µW en la muestra) de fibroblastos de pulmón humano normal incubados con 5 µg/cm² de partículas CCB (rojo, potencia láser promedio de 4 mW en la muestra, emisión detección: 400-410 nm en modo no desescaneado) a 37°C. Figura 5A. Células de control. Figura 5B. 4 h de incubación. Figura 5C. 8 h de incubación.

40

Figura 5D. 24 h de incubación. Barras de escala: 30 µm. Puntas de flecha: algunas ubicaciones de partículas CCB muy pequeñas, inmersas.

La figura 6 es una vista en perspectiva que explica una realización de un aparato para analizar partículas carbonosas en fluidos, células o tejidos de medios biológicos y portadores de origen no biológico de acuerdo con la presente divulgación.

45

Las figuras 7A, 7B y 7C son dibujos que muestran un esquema de una composición funcional de una sección de distribución de muestras del aparato para detectar y analizar partículas en fluidos.

50

La figura 8 es un dibujo que muestra una composición de la sección de detección óptica para detectar y analizar partículas carbonosas en aire, fluidos, células o tejidos de medios biológicos y portadores de origen no biológico.

La figura 9 es un diagrama de bloques que muestra una composición completa del aparato para analizar partículas en fluidos, células o tejidos de medios biológicos y portadores de origen no biológico mostrados en la figura 6.

55

La figura 10 es un dibujo que muestra una composición de la batería y la sección del controlador de temperatura del aparato para detectar y analizar partículas carbonosas.

La figura 11 es un diagrama de flujo (primera mitad) que muestra los procedimientos de análisis de orina que usa el aparato para analizar partículas en orina relacionadas con una realización de acuerdo con la presente divulgación.

- 5 La figura 12 es un diagrama de flujo (segunda mitad) que muestra los procedimientos de análisis de orina que usan el aparato para analizar partículas en orina relacionadas con una realización de acuerdo con la presente divulgación.

La figura 13 es un resultado ejemplar del agua ultrapura enriquecida linealmente con partículas carbonosas y medida utilizando el método inventado presentado para medir partículas carbonosas. Existe una relación lineal entre la concentración añadida de partículas carbonosas en agua ultrapura y la cantidad de partículas detectadas por ml de agua ultrapura. Los datos ($N = 3$) se grafican linealmente ($R^2 = 0.99$).

La figura 14 es un ejemplo de imagen de partículas carbonosas (600 $\mu\text{g/ml}$) en agua ultrapura, etanol y glicerol (temperatura ambiente) tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barras de escala: 15 μm . Banda de emisión: 450-650 nm.

La figura 15 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar partículas carbonosas en la orina del fluido corporal a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 50 μm . Banda de emisión: 450-650 nm.

La figura 16 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar partículas carbonosas en un medio portador no biológico de polidimetilsiloxano a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 50 μm . Banda de emisión: 450-650 nm.

La figura 17 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar compartimentos celulares de células fijas de fibroblastos de pulmón humano (línea celular MRC-5) que habían envuelto partículas carbonosas cuando se exponían a 5 $\mu\text{g/cm}^2$ de partículas a 37°C antes de la obtención de imágenes. La emisión de las partículas carbonosas se sondeó a 400-410 nm tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 20 μm .

La figura 18 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar células de fibroblastos de pulmón humano vivo (línea celular MRC-5) expuestas a partículas de 5 $\mu\text{g/cm}^2$ a 37°C. La emisión de las partículas carbonosas se ha sondeado a 400-410 nm tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 20 μm .

La figura 19 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar partículas carbonosas en la placenta del tejido biológico a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 25 μm . Banda de emisión: 450-650 nm.

La figura 20 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar partículas carbonosas en las hojas de hiedra de tejido vegetal biológico a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barra de escala: 50 μm . Banda de emisión: 450-650 nm.

La figura 21 es una representación esquemática del diagrama de flujo de un protocolo experimental optimizado para la detección de BC en orina.

La figura 22 es un resultado ejemplar obtenido al fotografiar partículas CB y/o BC en orina a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 9.7 mW en la muestra (excitación 810 nm) (usando el procedimiento como se representa en la figura 25). Barra de escala: 20 μm . Banda de emisión: 400-410 nm.

Figura 23. Imágenes TEM de los cuatro tipos diferentes de partículas de negro de carbono. Figura 23A. ufPL, Figura. 23B. ufP90, Figura 23C. CCB, y Figura 23D. fCB. Barra de escala: 200 nm.

Figura 24. Imagen de CCB en glicerol y aceite de inmersión utilizando dos potencias de iluminación diferentes de 5 y 10 mW en la muestra (810 nm, 150 fs, 80 MHz, láser MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.). Barras de escala: 50 μm . Banda de emisión: 450-650 nm.

Figura 25. Imágenes CCB en PDMS a temperatura ambiente tras la iluminación con una potencia láser promedio de 5 mW en la muestra (excitación 810 nm, 80 MHz). Barras de escala: 50 μm . Banda de emisión: 450-650 nm.

Figura 26. Gráfico de excitación-emisión bidimensional (similar a la figura 2B) de partículas de fCB en agua bajo excitación de fotón único. Cada corte vertical corresponde a un espectro de emisión a la longitud de onda de excitación.

Figura 27. Datos Raman de ufPL superpuestos sobre un fondo de luminiscencia razonable. El inserto muestra datos típicos para el carbono amorfo (azul), ajuste de línea Lorenciano triple (rojo), la corrección de la línea de base (azul,

línea discontinua), los resultados de ajuste de componentes espectrales (negro, raya punto) para las bandas D y G. Para mayor claridad, dos componentes se muestran desplazados verticalmente.

Figura 28. Espectros de luz blanca normalizados de diversas partículas carbonosas secas depositadas en una cubierta de vidrio. Las gotas de las suspensiones CB se secaron sobre los vidrios de cubierta y se iluminaron usando un láser de femtosegundo (810 nm, 150 fs, velocidad de repetición de 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.)

Figura 29. Los datos sin procesar de la figura 3B. Espectros de emisión de WL de suspensiones acuosas de uFP90 registradas a diferentes longitudes de onda de iluminación de femtosegundos (de 780 (1) a 900 nm (7), con un intervalo de 20 nm).

Figura 30. La respuesta temporal de las partículas de CCB secadas en vidrio (1) y en suspensión acuosa (2) medida por tiempo de conteo de fotones individuales correlacionados con el tiempo. La función de respuesta del instrumento (IRF) se superpone (3). La fuerza relativa de la señal no puede deducirse de los valores máximos relativos de las curvas ya que se usaron diferentes concentraciones de partículas al realizar el experimento en estado seco y acuoso.

Figura 31. Comparación de la iluminación de femtosegundos y picosegundos de partículas CB a 810 nm. Se aplicó una potencia láser promedio de 10 mW en la muestra a fCB similar a las condiciones experimentales anteriores. La misma área se grabó consecutivamente con un sistema láser de siete picosegundos (Levante OPO, APE, Berlín bombeado por un tren de pulsos de 532 nm desde un láser Picotrain, HighQ, Austria) y un láser de femtosegundo (810 nm, 150 fs, 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.). Los láseres se cambiaron entre cuadros individuales. Barras de escala: 5 μ m.

Figura 32. Dependencia de la potencia de emisión de una muestra de partículas uFP sumergidas. Los espectros de potencia se registraron utilizando un microscopio multifotón con excitación de 800 nm mediante un láser de femtosegundo (810 nm, 150 fs, tasa de repetición de 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, EE. UU.) y un objetivo de 1.05 NA (Olympus, Japón). Como los tubos fotomultiplicadores se saturaron rápidamente con la emisión de CB, se midió el número efectivo de píxeles visibles en una exploración. Por lo tanto, se estableció un umbral constante y se calculó el número de píxeles mediante una rutina MATLAB.

Figura 33. Citoesqueleto de tubulina (ex/em 495/519 nm) de fibroblastos de pulmón humanos normales fijos (línea celular MRC-5) incubados a 37°C con 5 μ g/cm² de partículas uFP90 (rojo, potencia de iluminación promedio de 4 mW en las muestras a 810 nm, detección de banda de emisión: 400-410 nm en modo no desescaneado). (A) Células de control. (B) 4 h de incubación. (C) 8 h de incubación. (D) 24 h de incubación. Barra de escala: 20 μ m.

Referencias a la solicitud

ASTM, American Society for Testing Materials D3053-13a, Standard on Terminology Relating to Carbon Black. ASTM International: West Conshohocken, PA, 2013.

Castro, L.; Pio, C.; Harrison, R. M.; Smith, D. Atmos. Environ. 1999, 33, (17), 2771-2781.

Arnal, C.; Alzueta, M.; Millera, A.; Bilbao, R. Combust. Sci. Technol. 2012, 184, (7-8), 1191-1206.

Wang, R., Global Emission Inventory and Atmospheric Transport of Black Carbon: Evaluation of the Associated Exposure. Springer Theses: Beijing, China, 2015.

J. C. G. Esteves da Silva and H. M. R. Goncalves, Trends Anal. Chem., 2011, 30, 1327.

Chow, J. C.; Watson, J. G.; Doraiswamy, P.; Chen, L.-W. A.; Sodeman, D. A.; Lowenthal, D. H.; Park, K.; Arnott, W. P.; Motallebi, N. Atmos. Res. 2009, 93, (4), 874-887.

Nemmar, A.; Hoet, P. M.; Vanquickenborne, B.; Dinsdale, D.; Thomeer, M.; Hoylaerts, M.; Vanbilloen, H.; Mortelmans, L.; Nemery, B. Circulation 2002, 105, (4), 411-414.

Ferrari, A.; Meyer, J.; Scardaci, V.; Casiraghi, C.; Lazzeri, M.; Mauri, F.; Piscanec, S.; Jiang, D.; Novoselov, K.; Roth, S. Phys. Rev. Lett. 2006, 97, (18), 187401.

Belousova, I.; Mironova, N.; Scobelev, A.; Yur'ev, M. Opt. Commun. 2004, 235, (4), 445-452.

Zelensky, S. Semicond. Phys. Quantum Electron. Optoelectron. 2004, 7, (2), 190-194.

Rulik, J. J.; Mikhailenko, N.; Zelensky, S.; Kolesnik, A. Semicond. Phys. Quantum Electron. Optoelectron. 2007, 10, (2), 6-10.

- Strek, W.; Cichy, B.; Radosinski, L.; Gluchowski, P.; Marciniak, L.; Lukaszewicz, M.; Hreniak, D. *Light Sci. Appl.* 2015, 4, (1), e237.
- 5 Hamilton, B.; Rimmer, J.; Anderson, M.; Leigh, D. *Adv. Mater.* 1993, 5, (7-8), 583-585.
- Imholt, T.; Dyke, C. A.; Hasslacher, B.; Perez, J. M.; Price, D.; Roberts, J. A.; Scott, J.; Wadhawan, A.; Ye, Z.; Tour, J. M. *Chem. Mater.* 2003, 15, (21), 3969-3970.
- 10 Fougereau, F.; Fabre, J.-C. In *Nonlinear mechanisms in carbon-black suspension in a limiting geometry*, MRS Proceedings, 1997; Cambridge Univ. Press: p 293.
- Li, H.; Kang, Z.; Liu, Y.; Lee, S.-T. *J. Mater. Chem.* 2012, 22, (46), 24230-24253.
- 15 Ghosh, S.; Chizhik, A. M.; Karedla, N.; Dekaliuk, M. O.; Gregor, I.; Schuhmann, H.; Seibt, M.; Bodensiek, K.; Schaap, I. A.; Schulz, O. *Nano Lett.* 2014, 14, (10), 5656-5661.
- Usman, A.; Chiang, W. Y.; Masuhara, H. *Sci. Prog.* 2013, 96, (Pt 1), 1-18.
- 20 Usman, A.; Chiang, W.-Y.; Masuhara, H. In *Femtosecond trapping efficiency enhanced for nano-sized silica spheres*, 2012; pp 845833-845833-7.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar la presencia o cuantificación de partículas de negro de carbono y/o carbono negro en una muestra o medio portador, en el que el método comprende los pasos de:
- 10 1) proporcionar la muestra o el medio portador sin etiquetar o pretratar las partículas de negro de carbono y/o carbono negro,
- 2) iluminar la muestra o el medio portador a una temperatura inferior a 90°C mediante luz láser pulsada de femtosegundos con una duración de pulso inferior a 500 femtosegundos, una tasa de repetición por encima de 1 MHz con una potencia promedio por debajo de 20 mW, y una longitud de onda que varía de 700 a 1200 nm, para generar una emisión de luz no relacionada con la incandescencia de dichas partículas de negro de carbono y/o carbono negro y
- 15 3) análisis de dicha emisión de luz
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra líquida, muestra celular o muestra de tejido de origen biológico, en el que las células en la muestra celular o muestra de tejido tienen un contenido de agua intracelular superior al 40%.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, mediante el cual la iluminación se realiza mediante un láser de femtosegundo enfocado en la muestra usando un suministro de haz estacionario o de exploración.
- 25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra o el medio portador se ilumina a una temperatura entre 1°C y 80°C.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra o medio portador se ilumina a una temperatura entre 10°C y 50°C.
- 30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra es sangre u orina.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para detectar la presencia o cuantificación de partículas de carbono negro.
- 35 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para detectar la presencia de partículas de carbono negro agregadas.
- 40 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra o el medio portador comprende partículas de negro de carbono o de carbono negro de la contaminación ambiental o industrial.

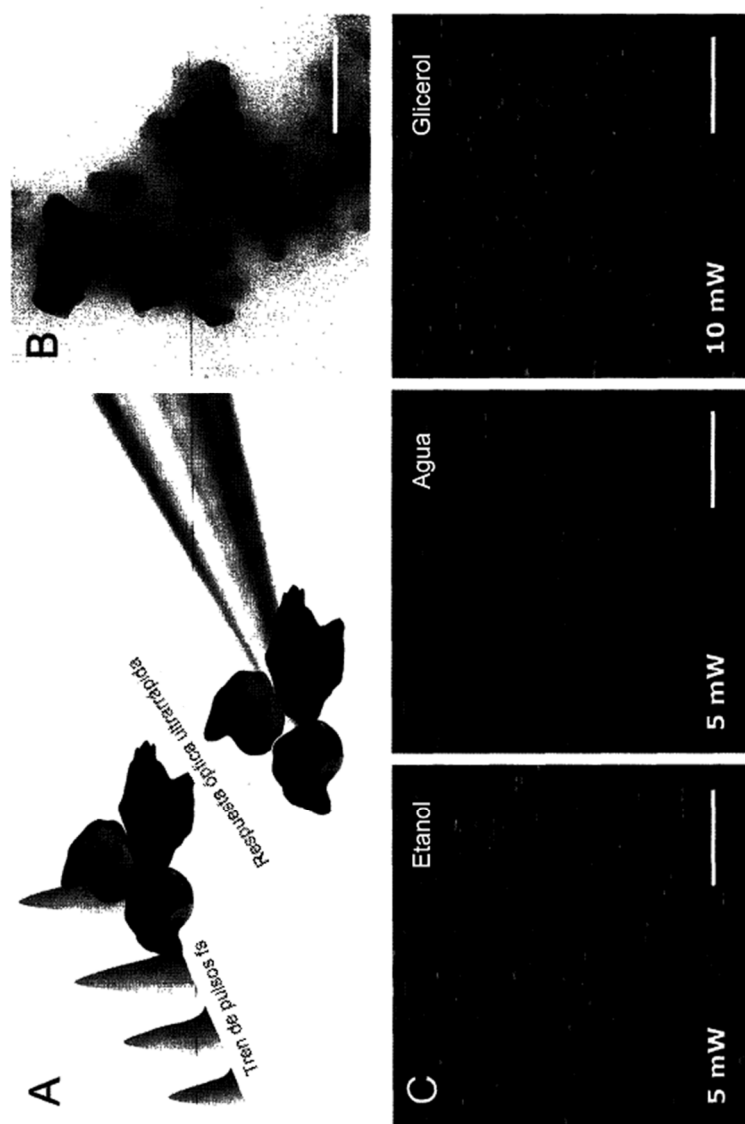


Figura 1.

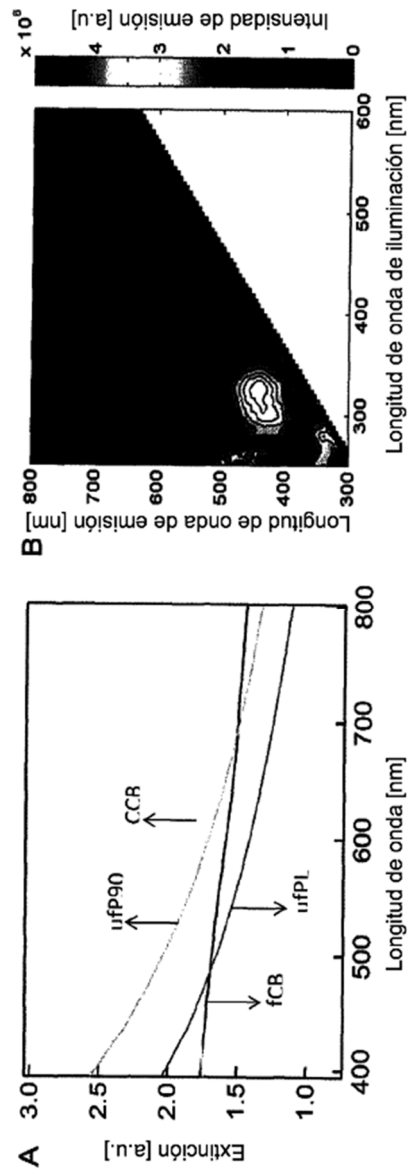


Figura 2.

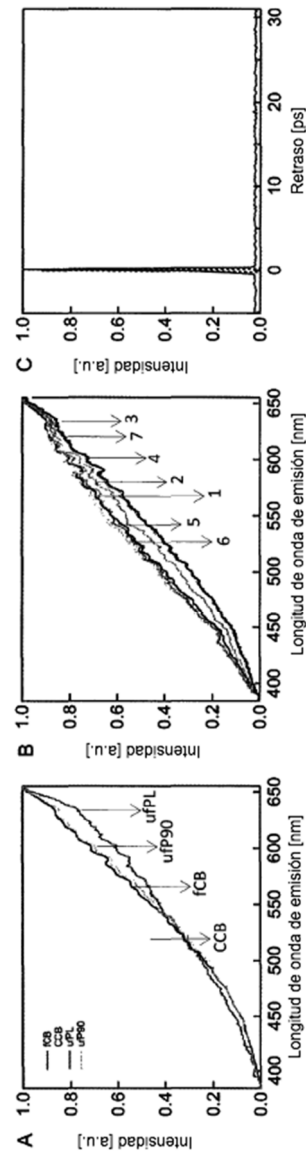


Figura 3

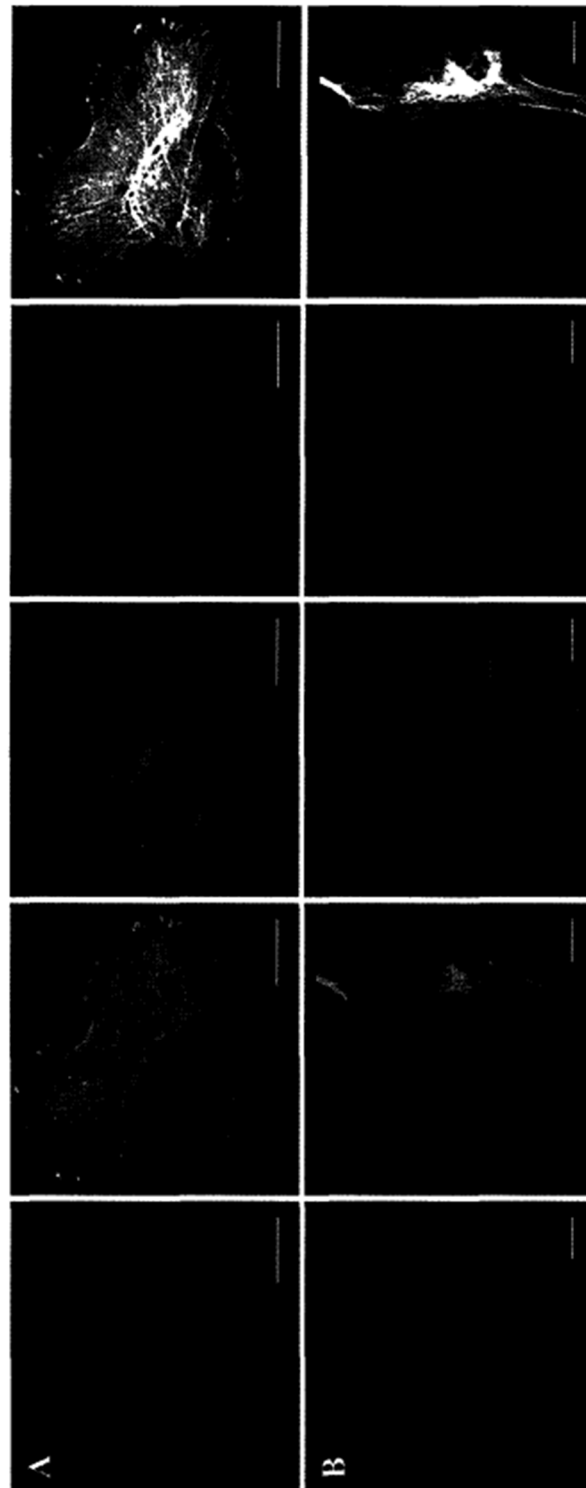


Figura 4.

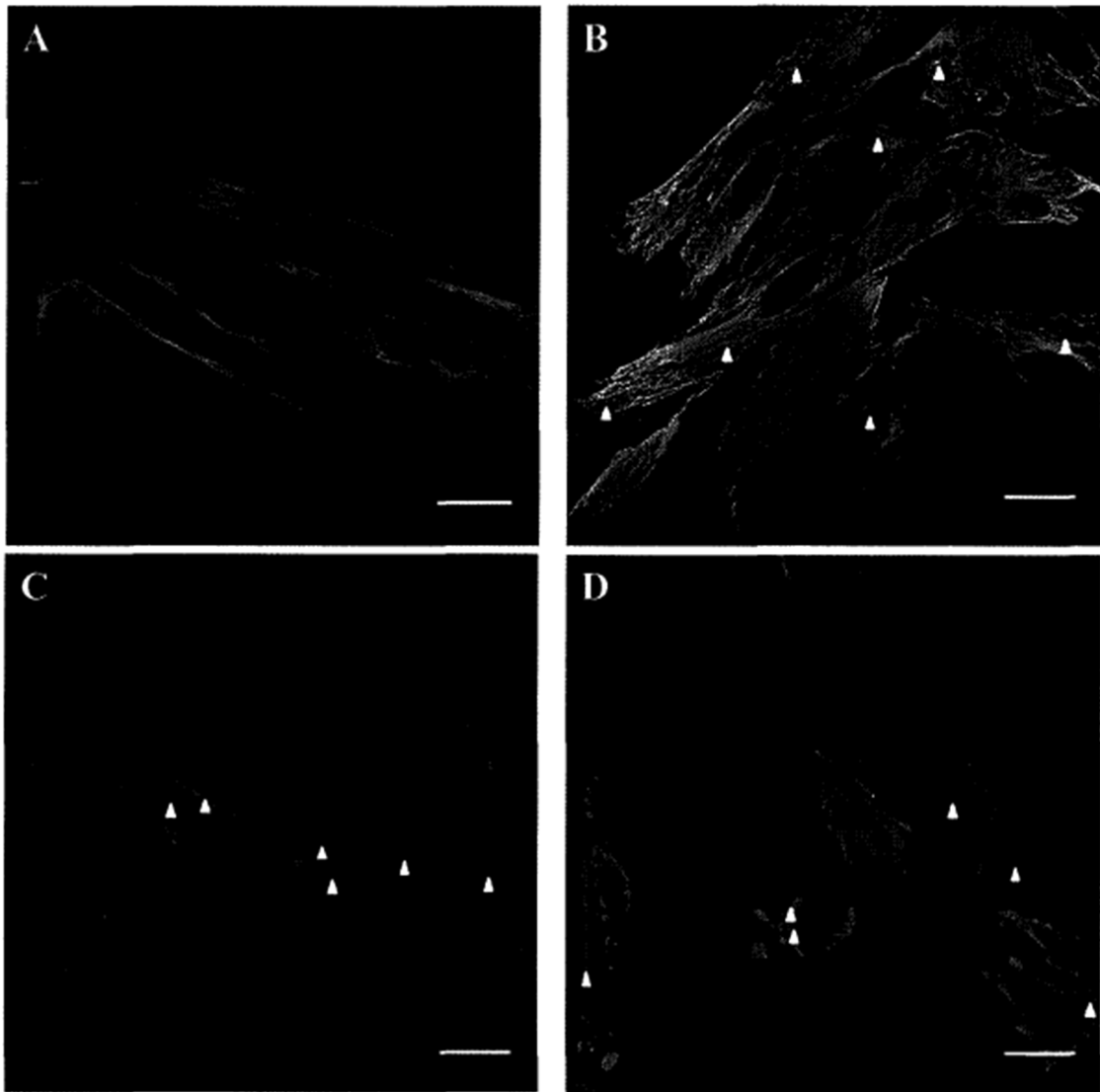


Figura 5.

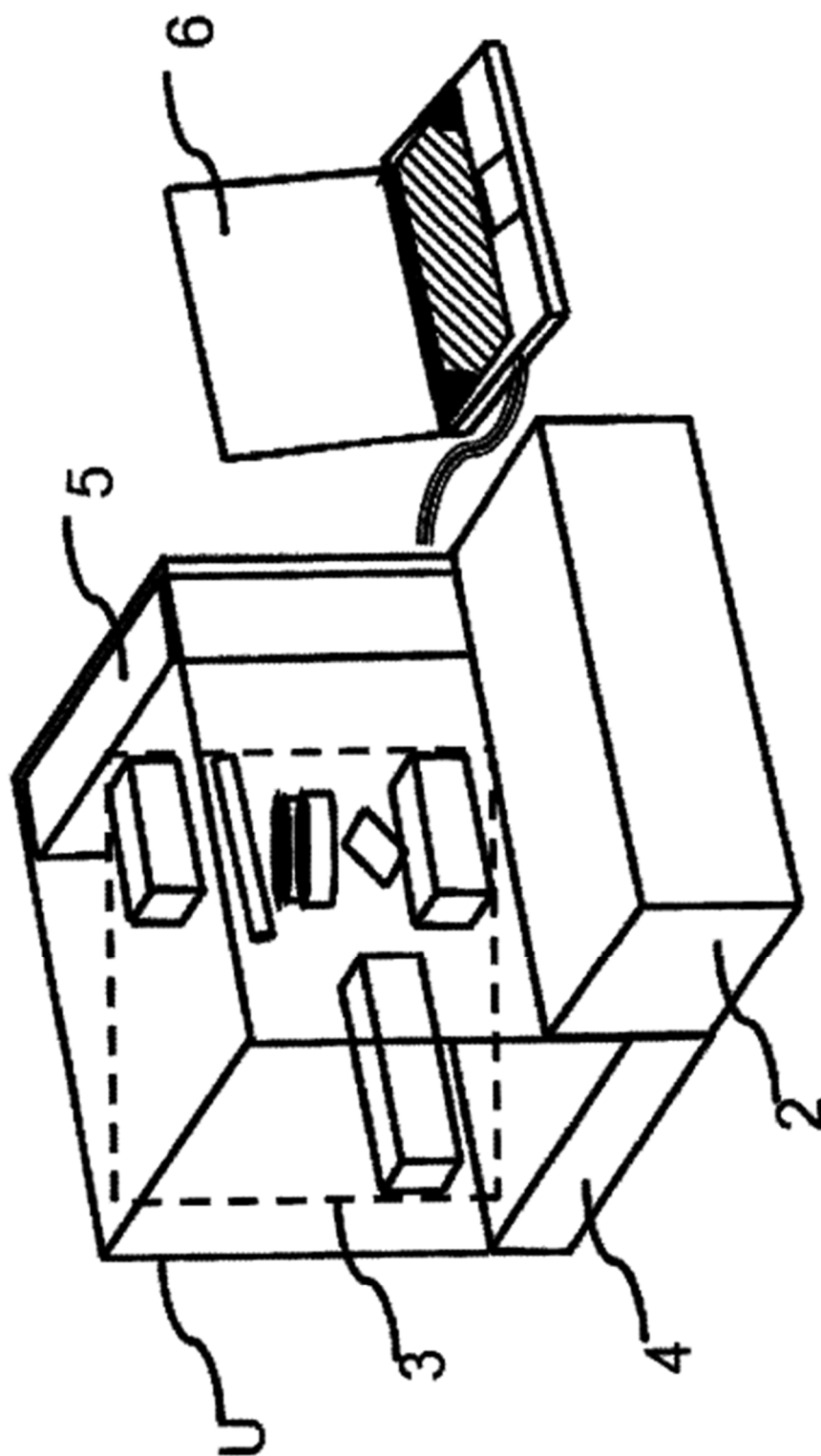


Figura 6.

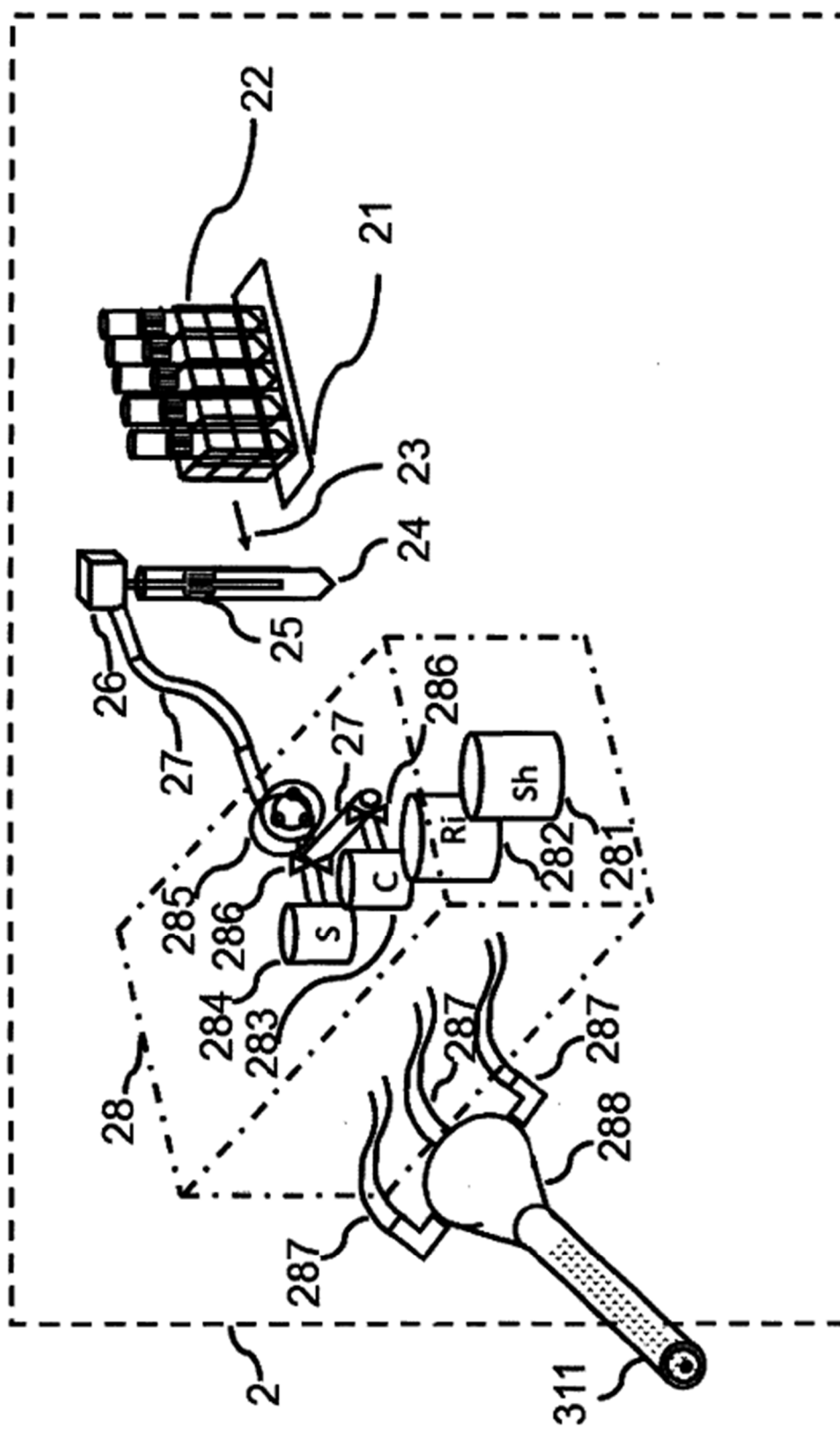


Figura 7A.

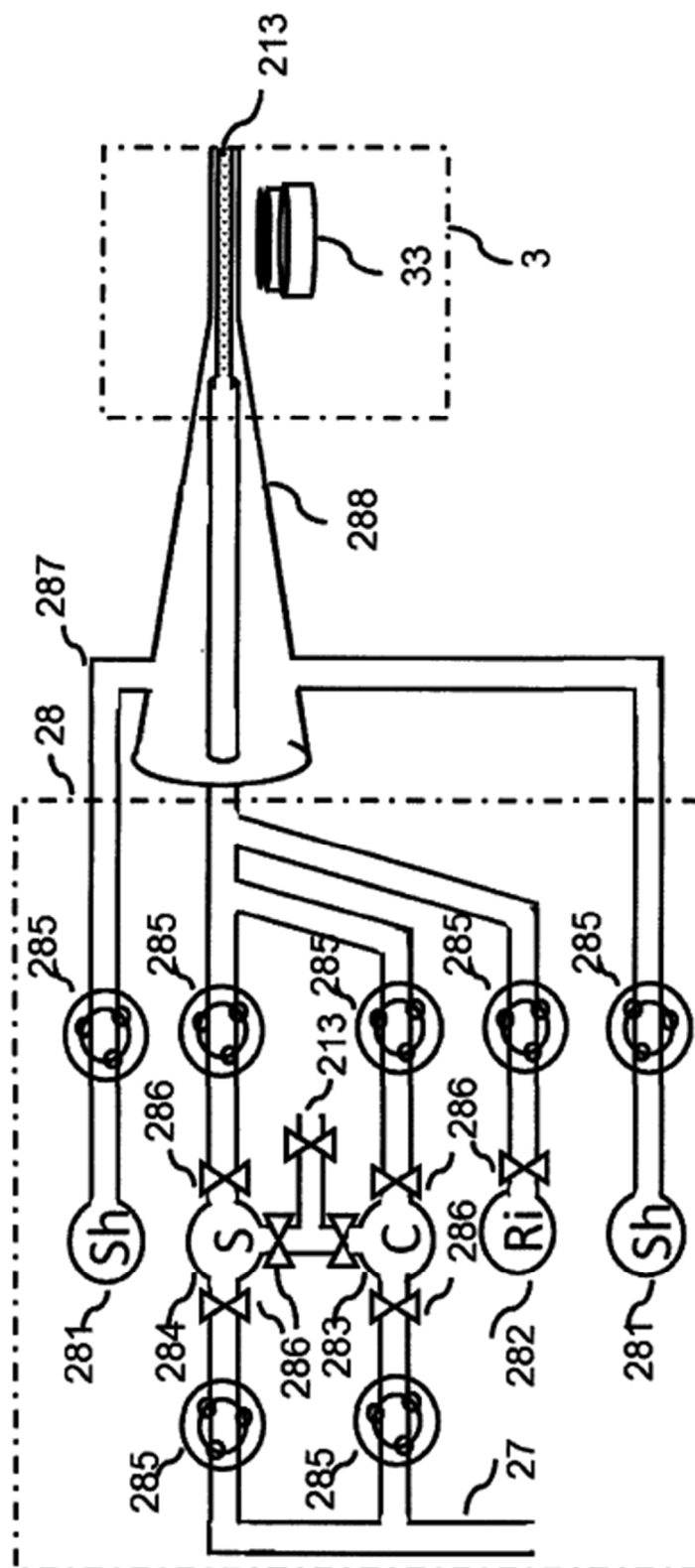


Figura 7B.

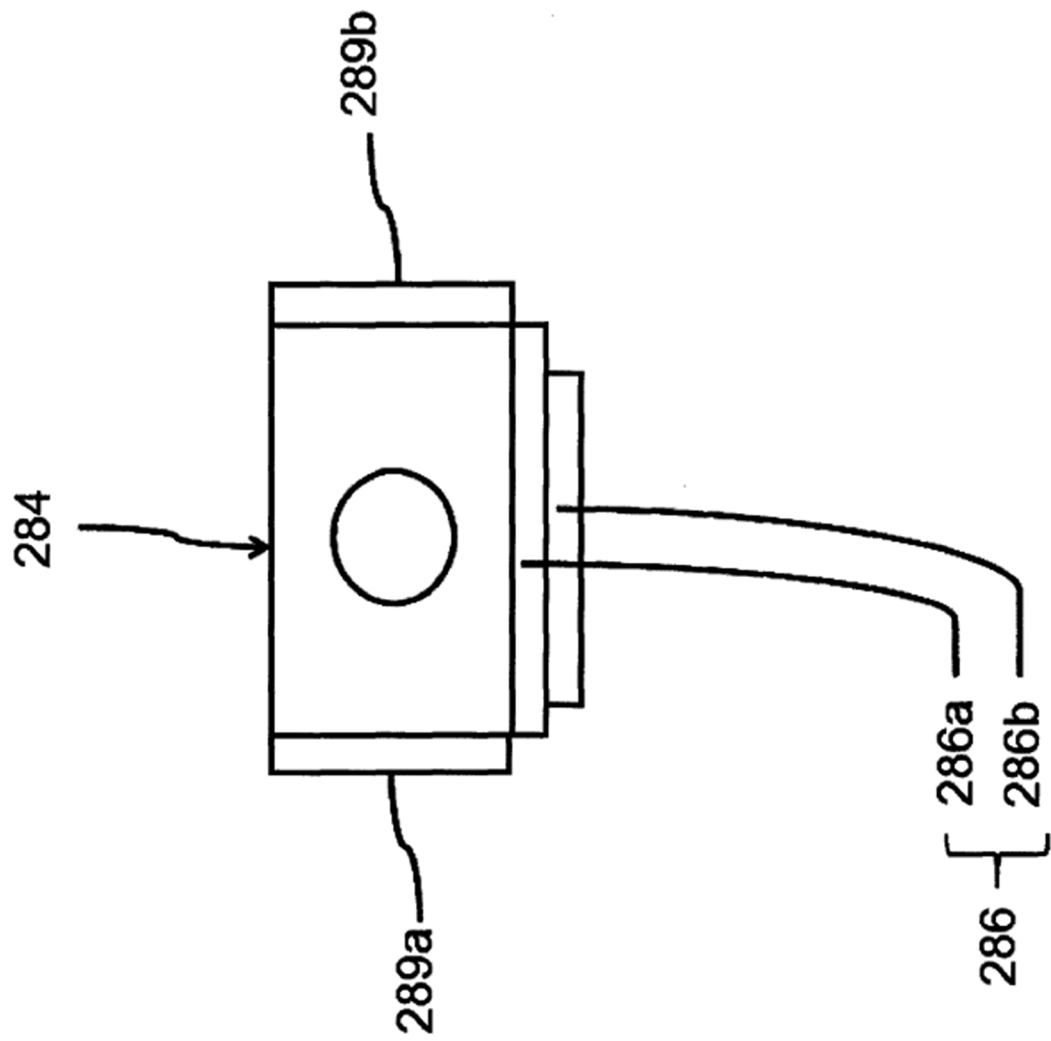


Figura 7C.

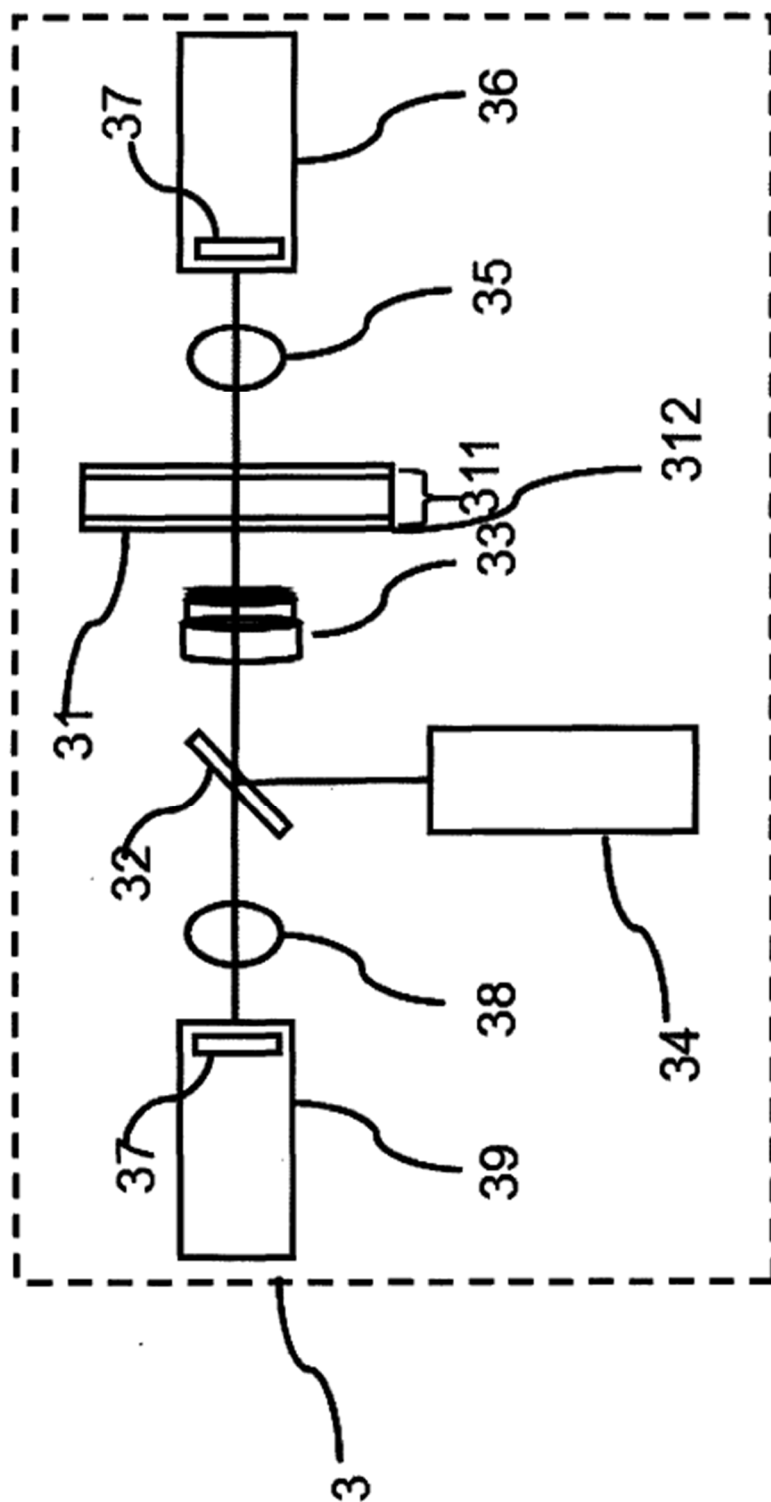


Figura 8.

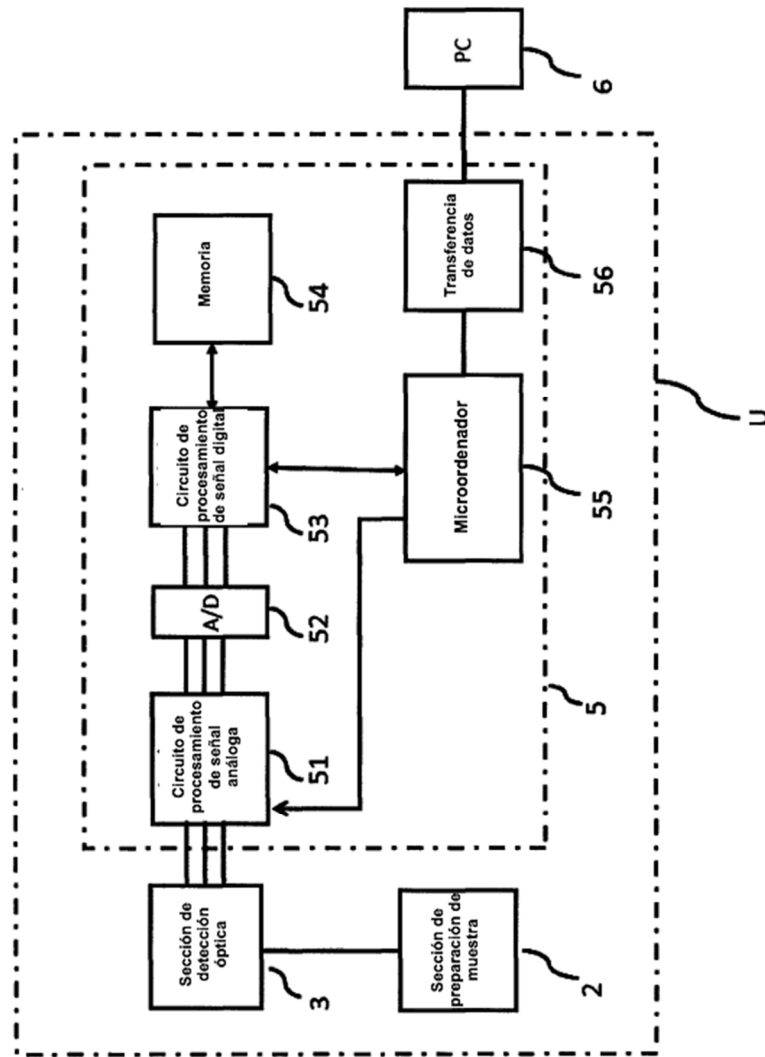


Figura 9.

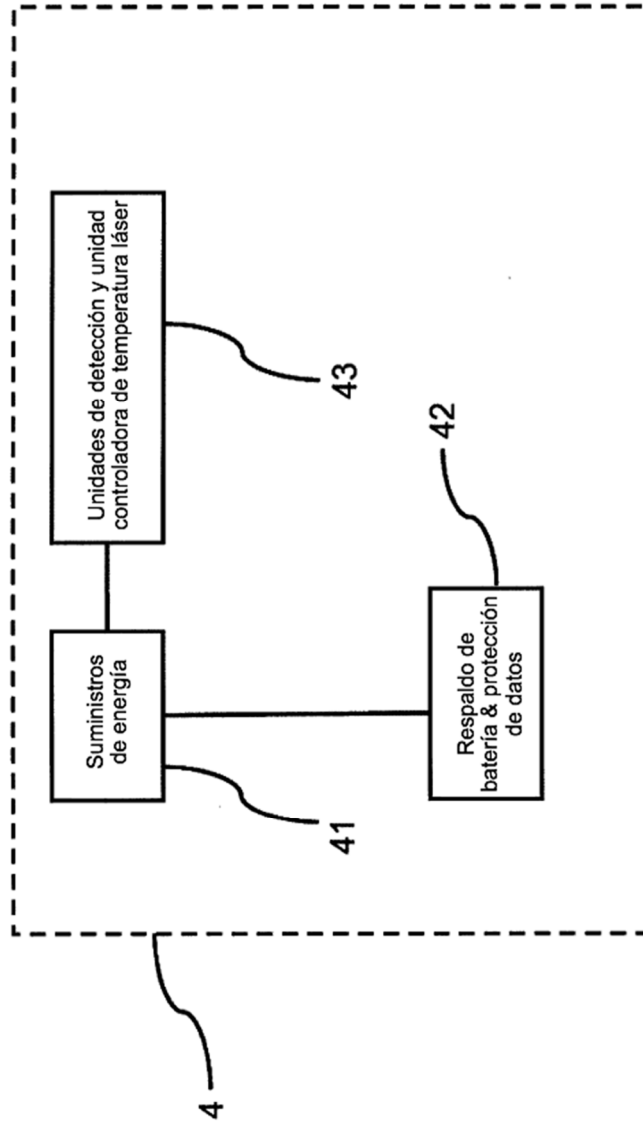


Figura 10.

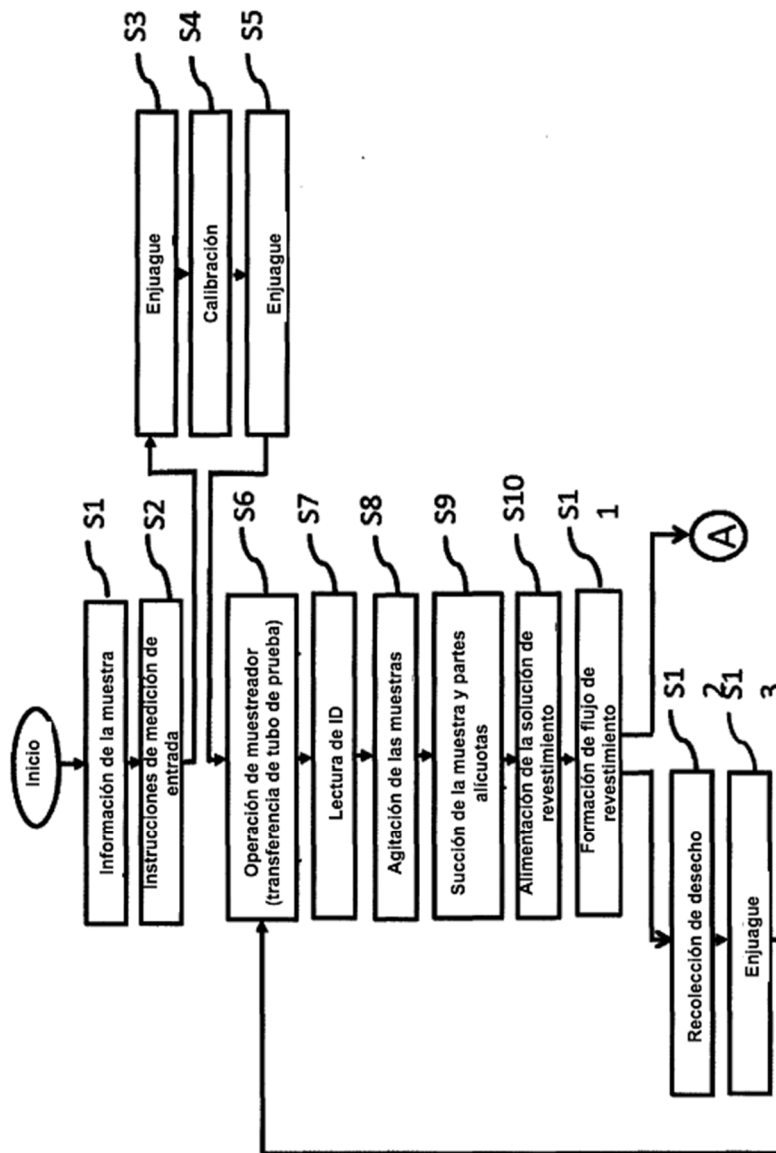


Figura 11.

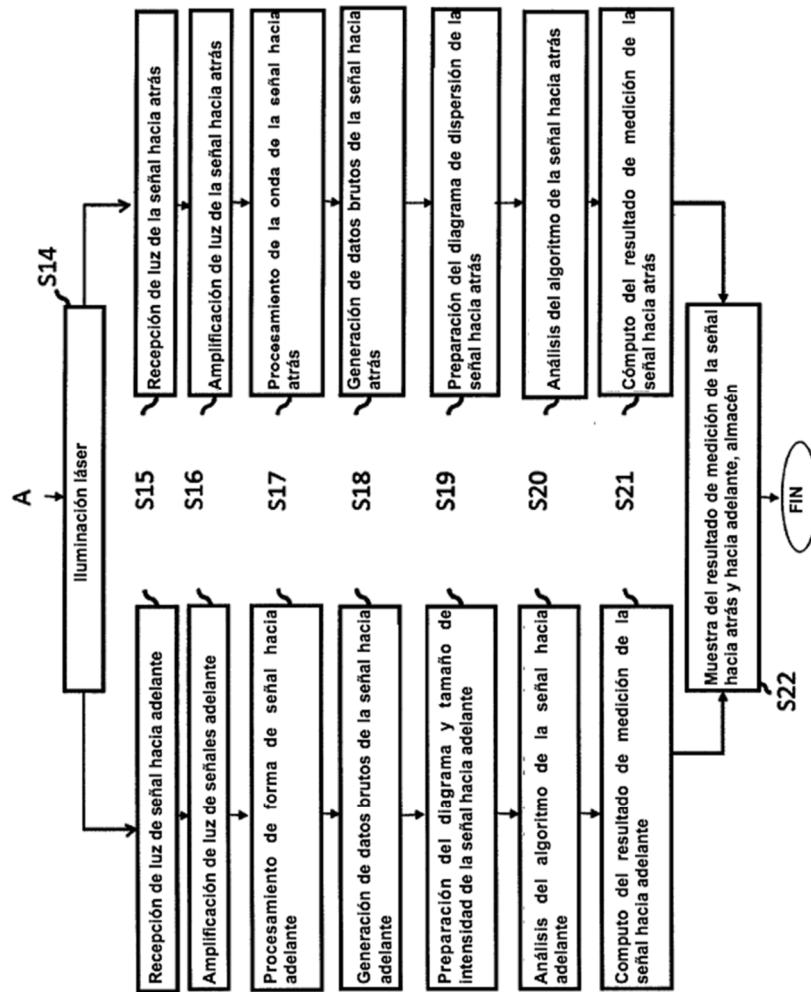


Figura 12.

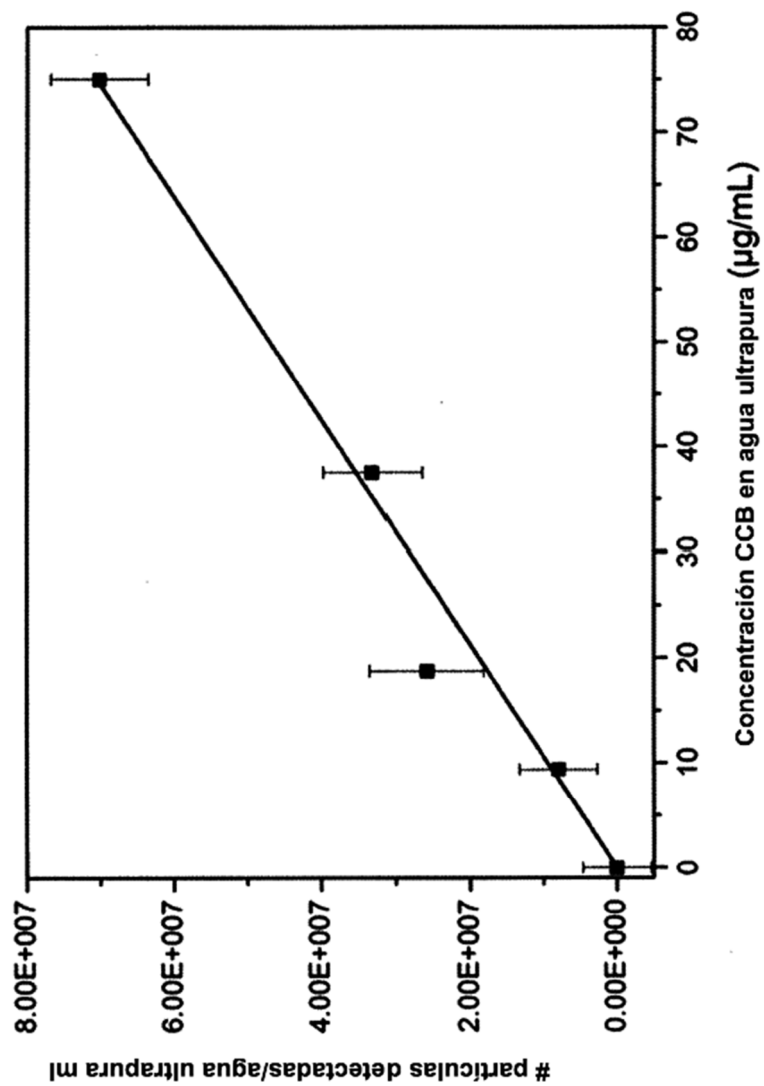


Figura 13.

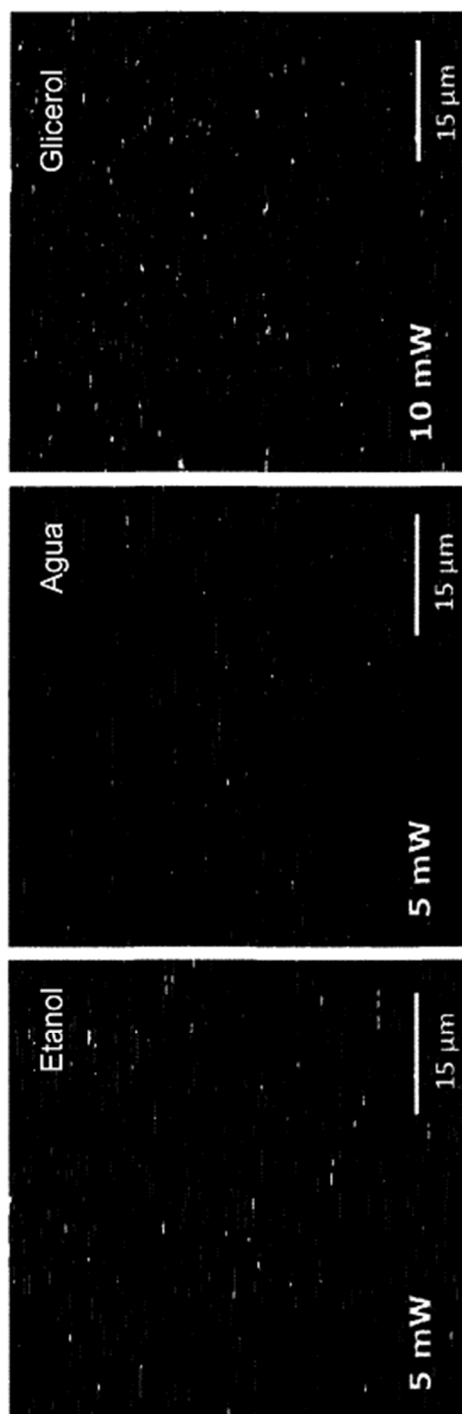


Figura 14.

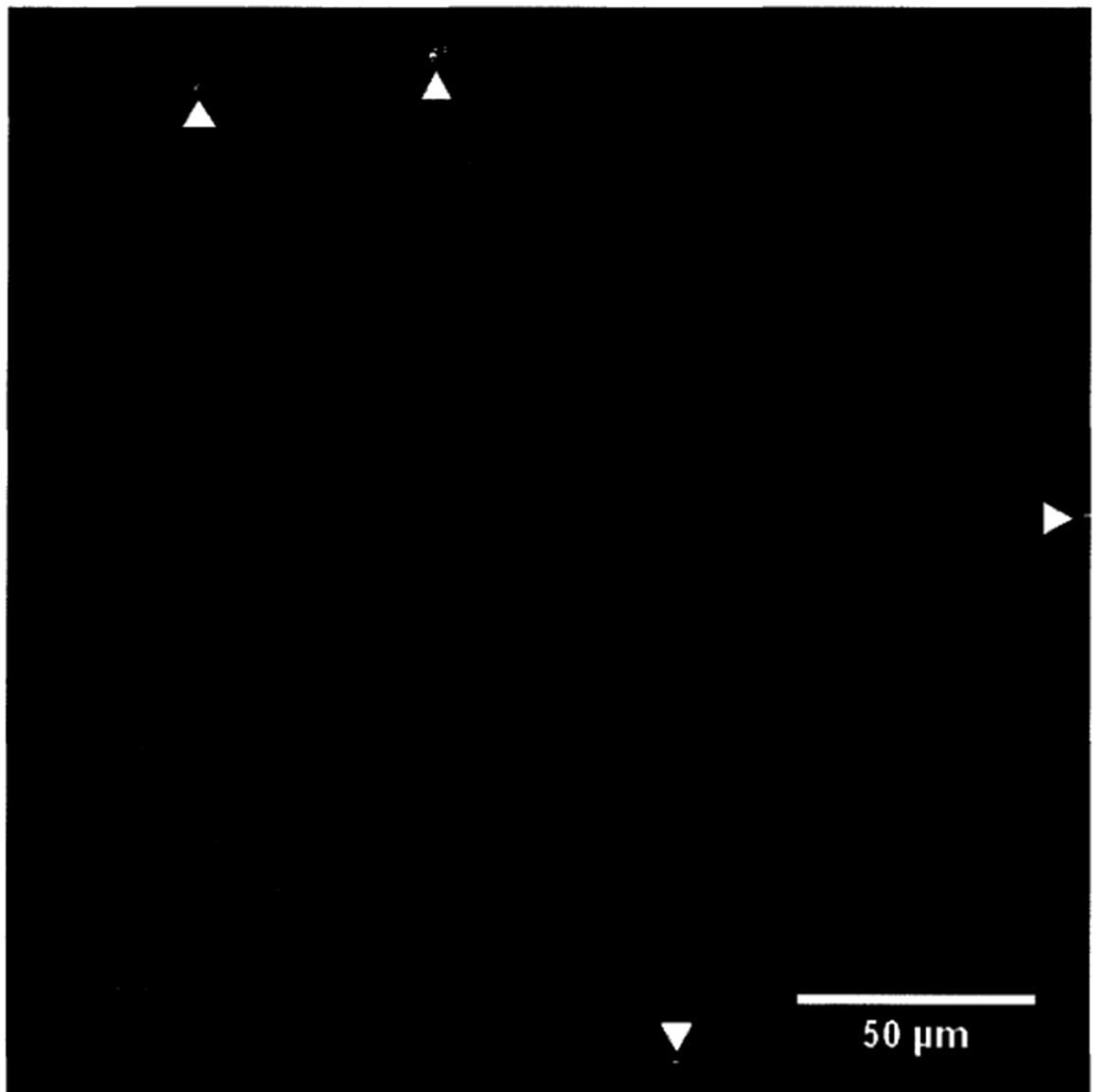


Figura 15.

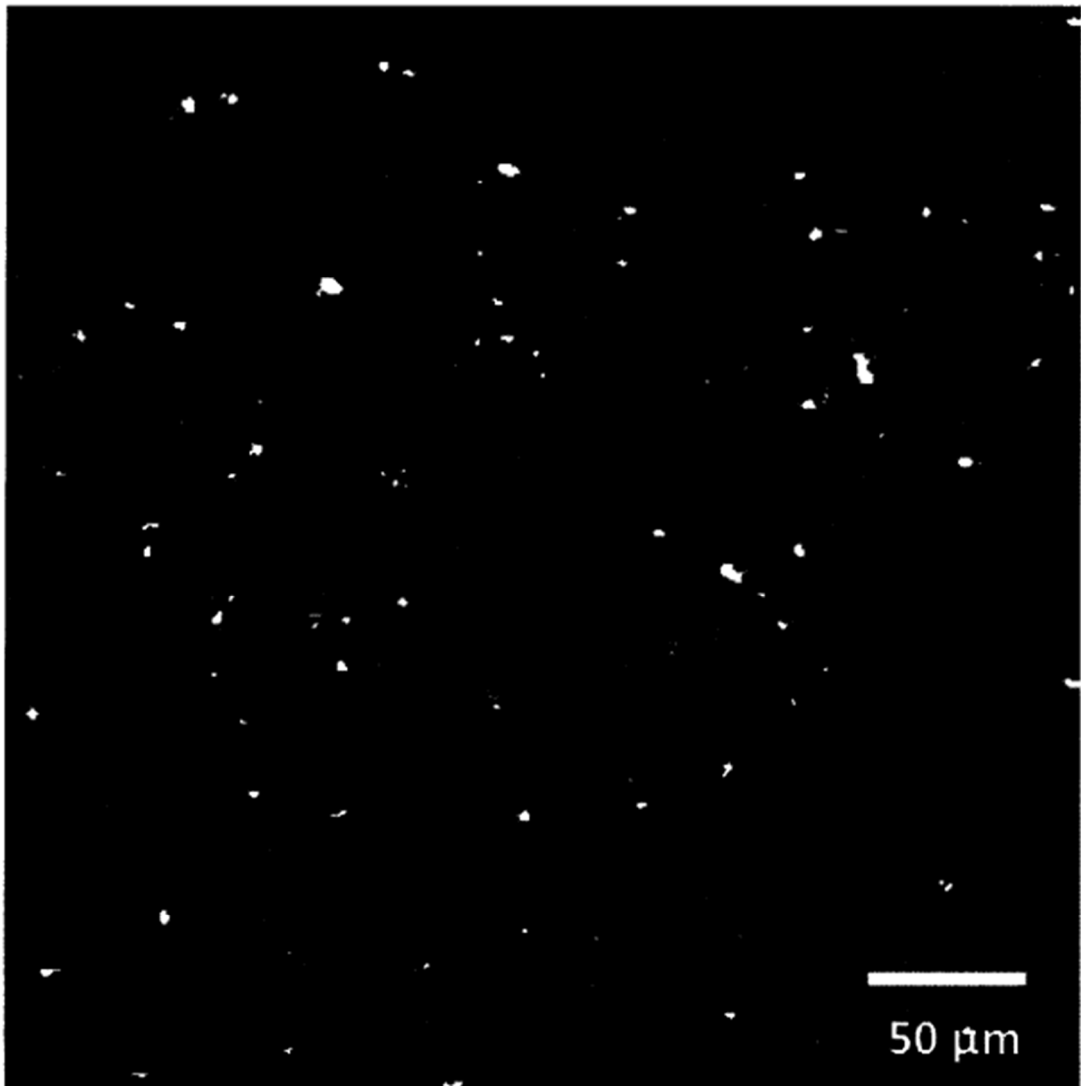


Figura 16.

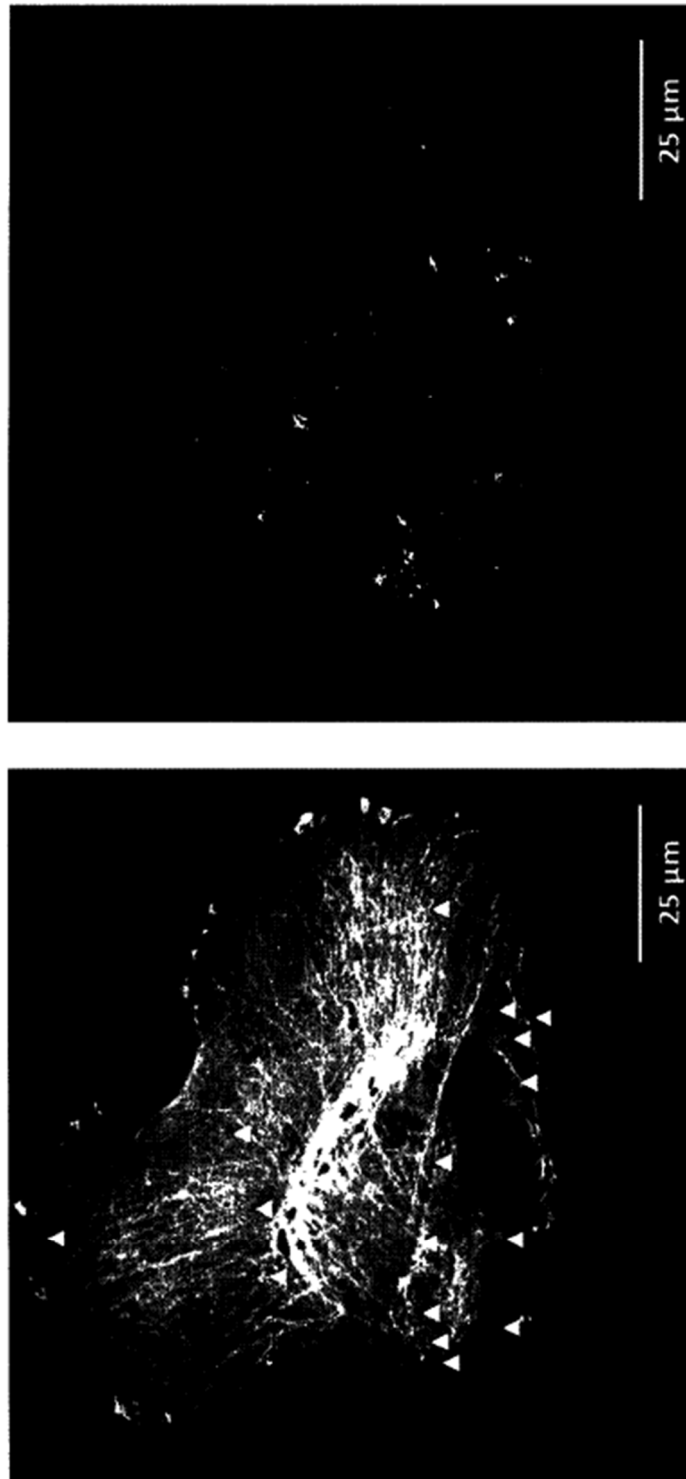


Figura 17.

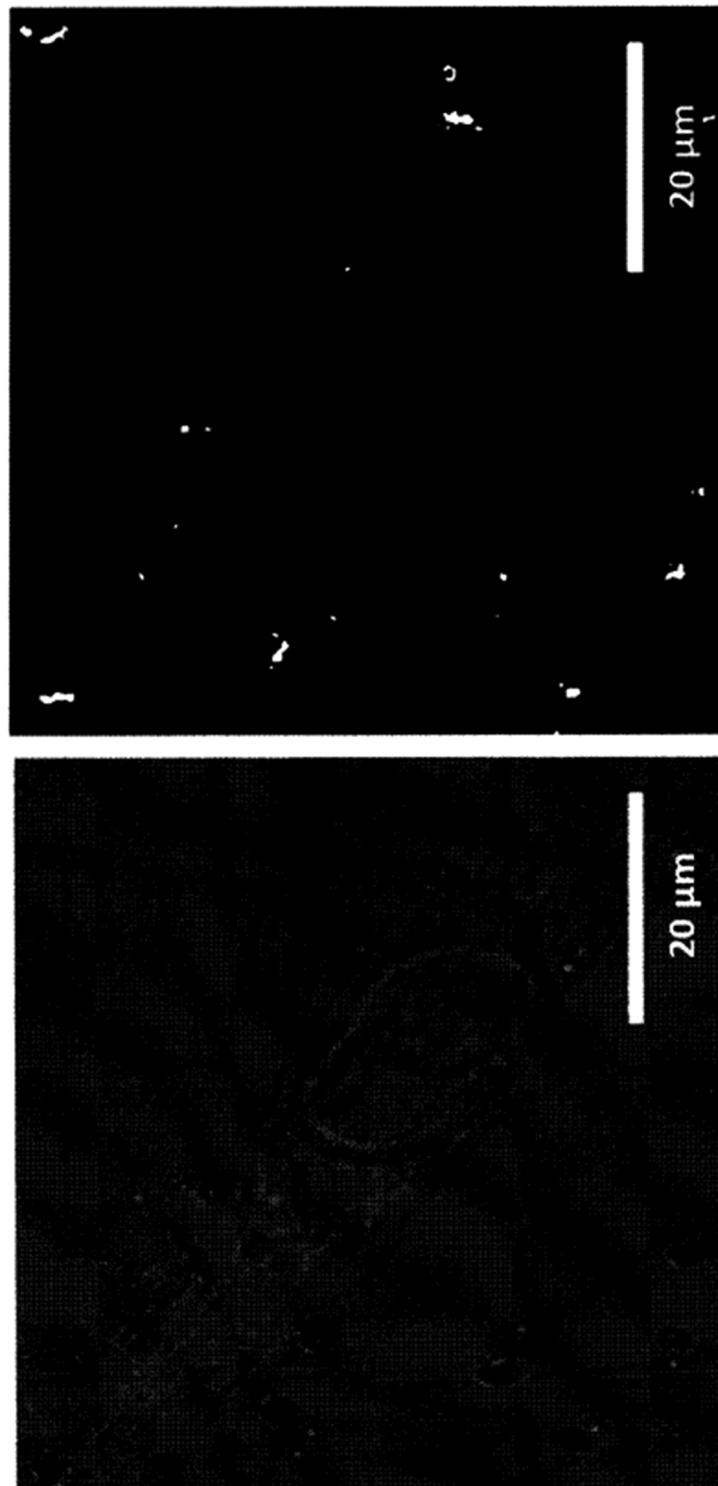


Figura 18.

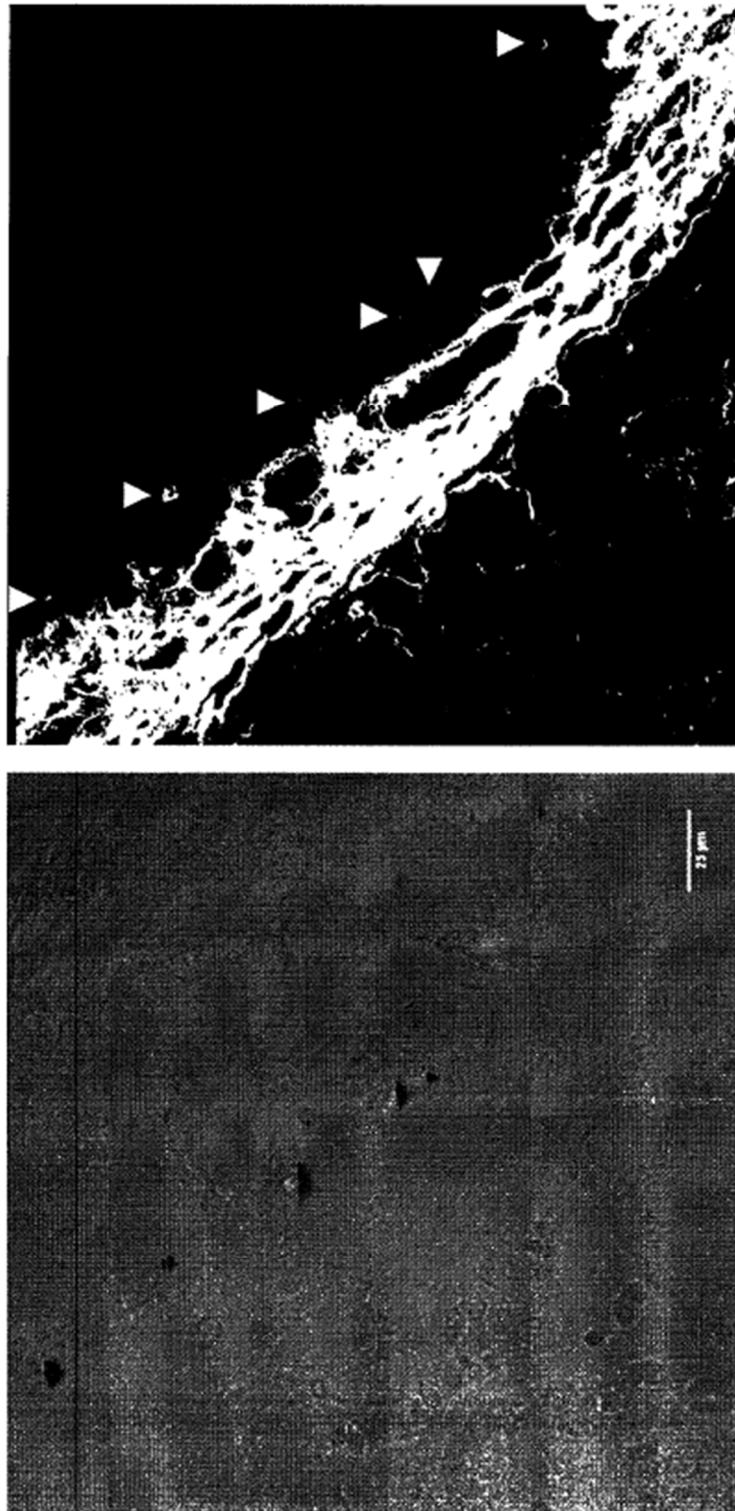


Figura 19.

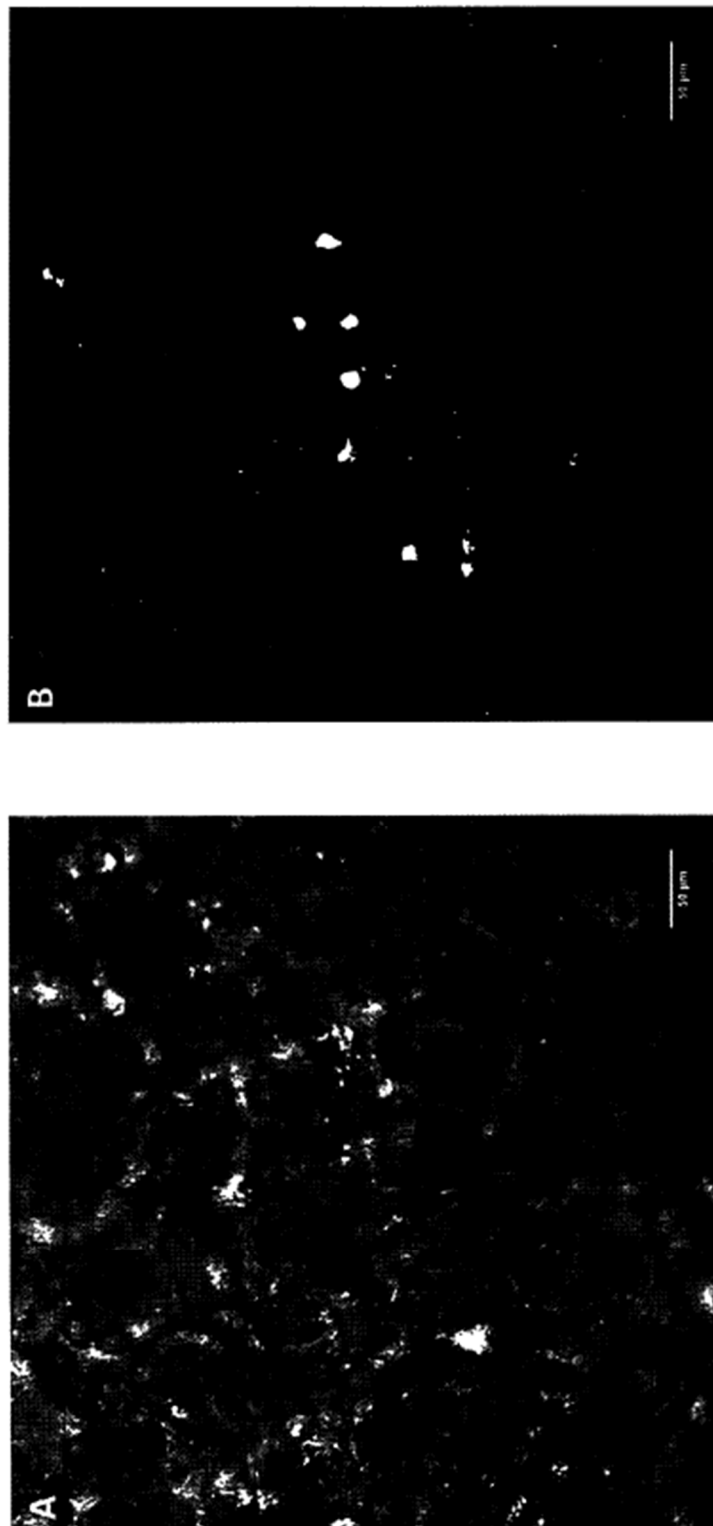


Figura 20.

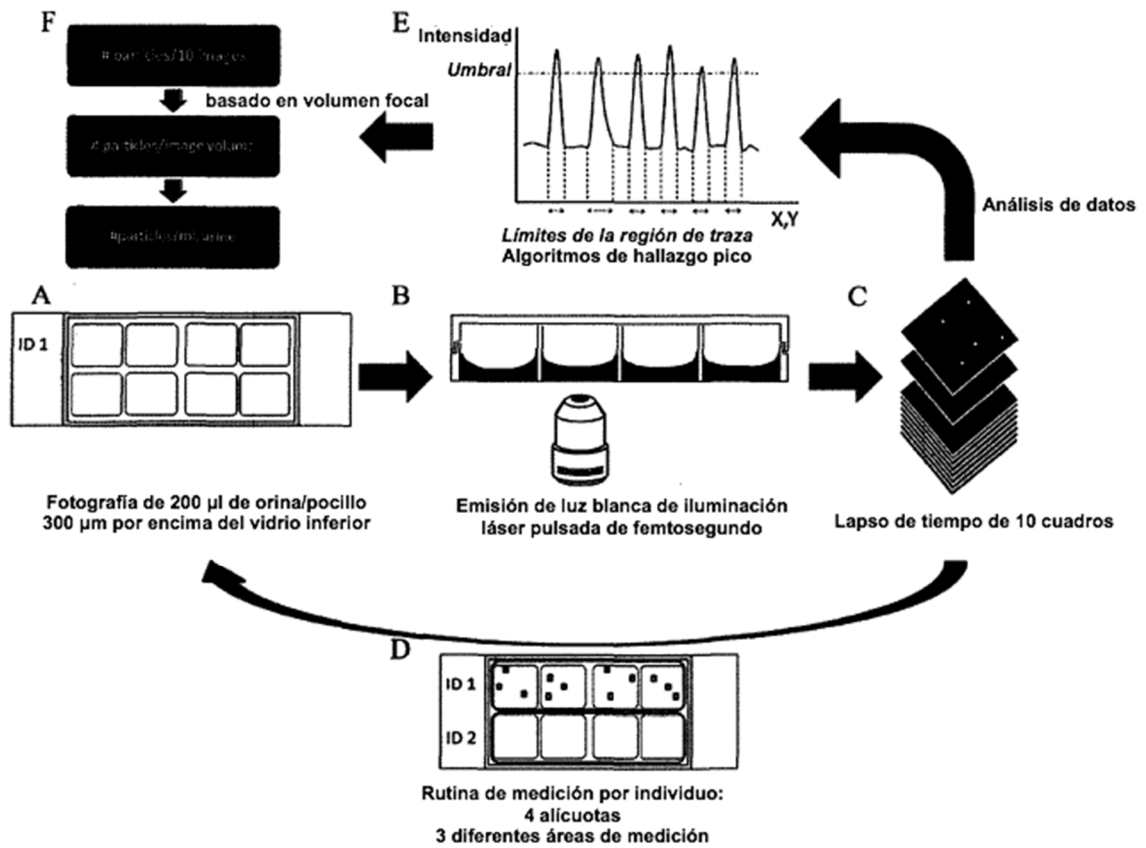


Figura 21

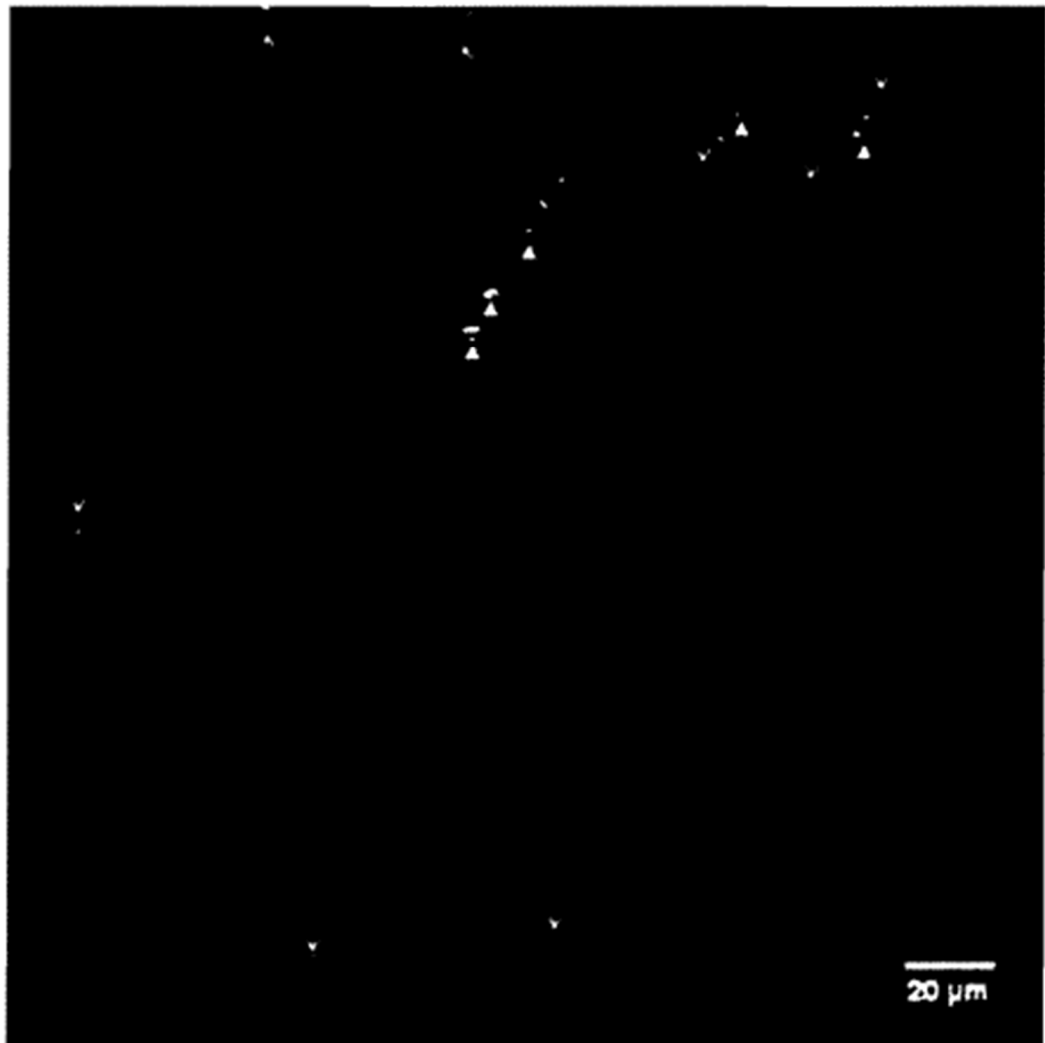


Figura 22

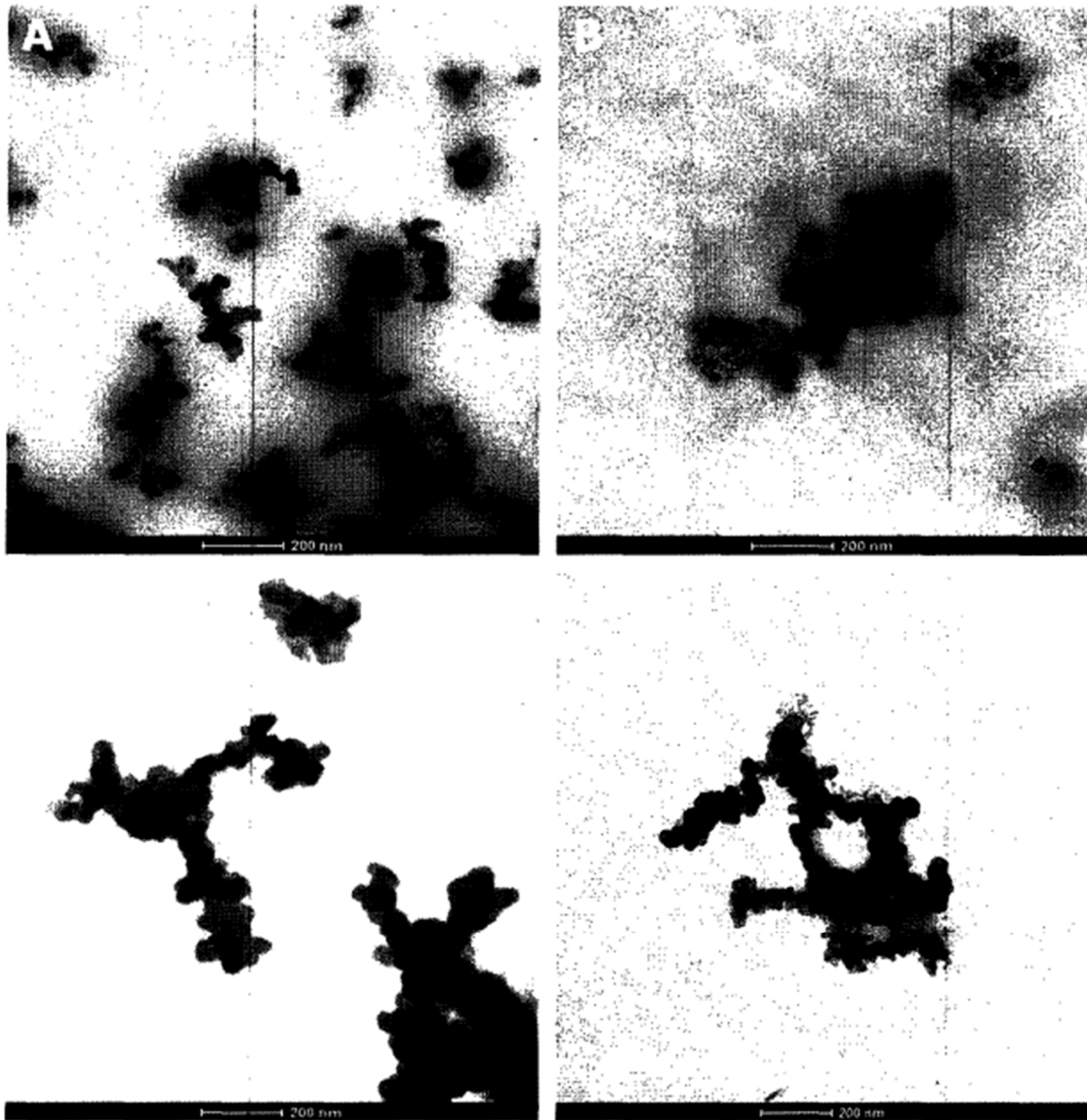


Figura 23.

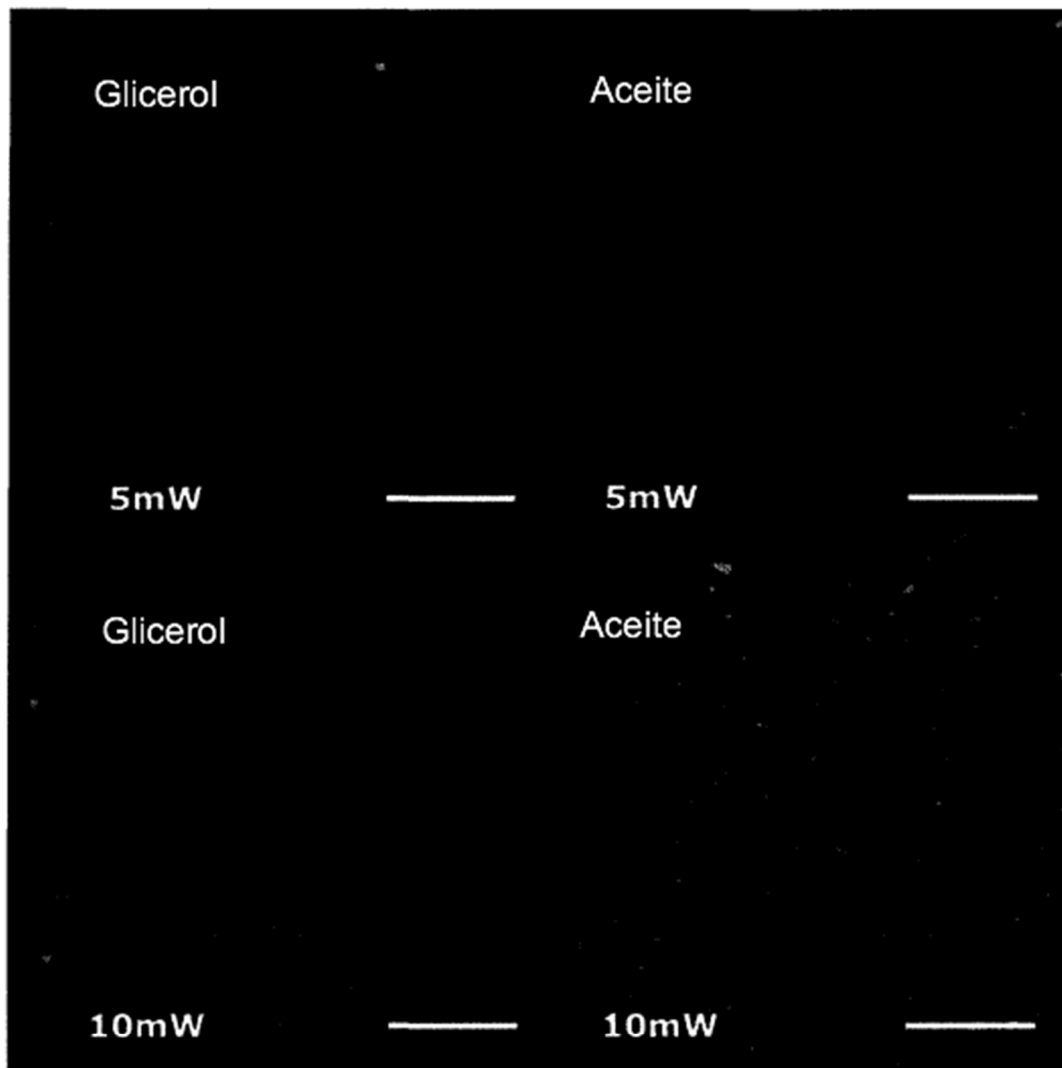


Figura 24

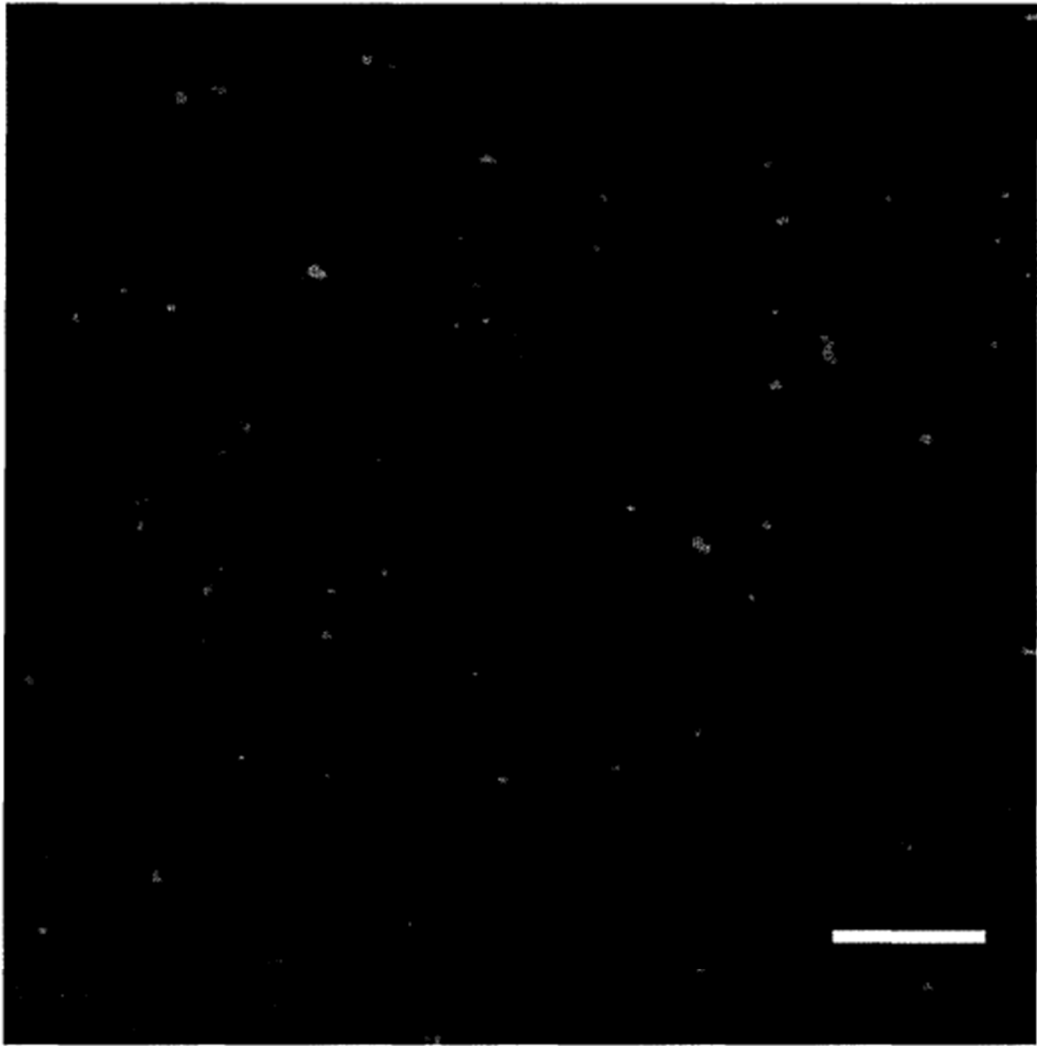


Figura 25.

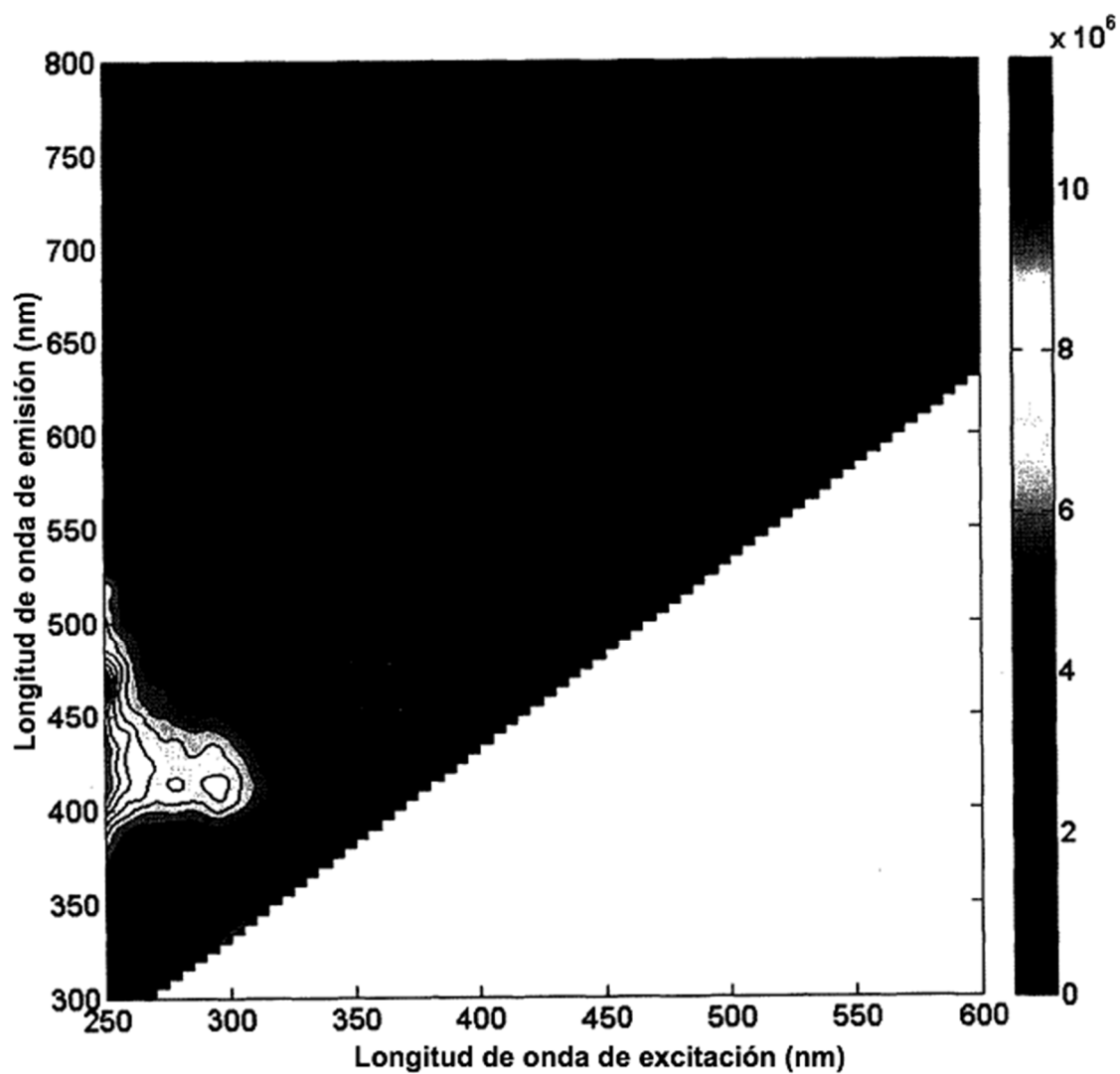


Figura 26.

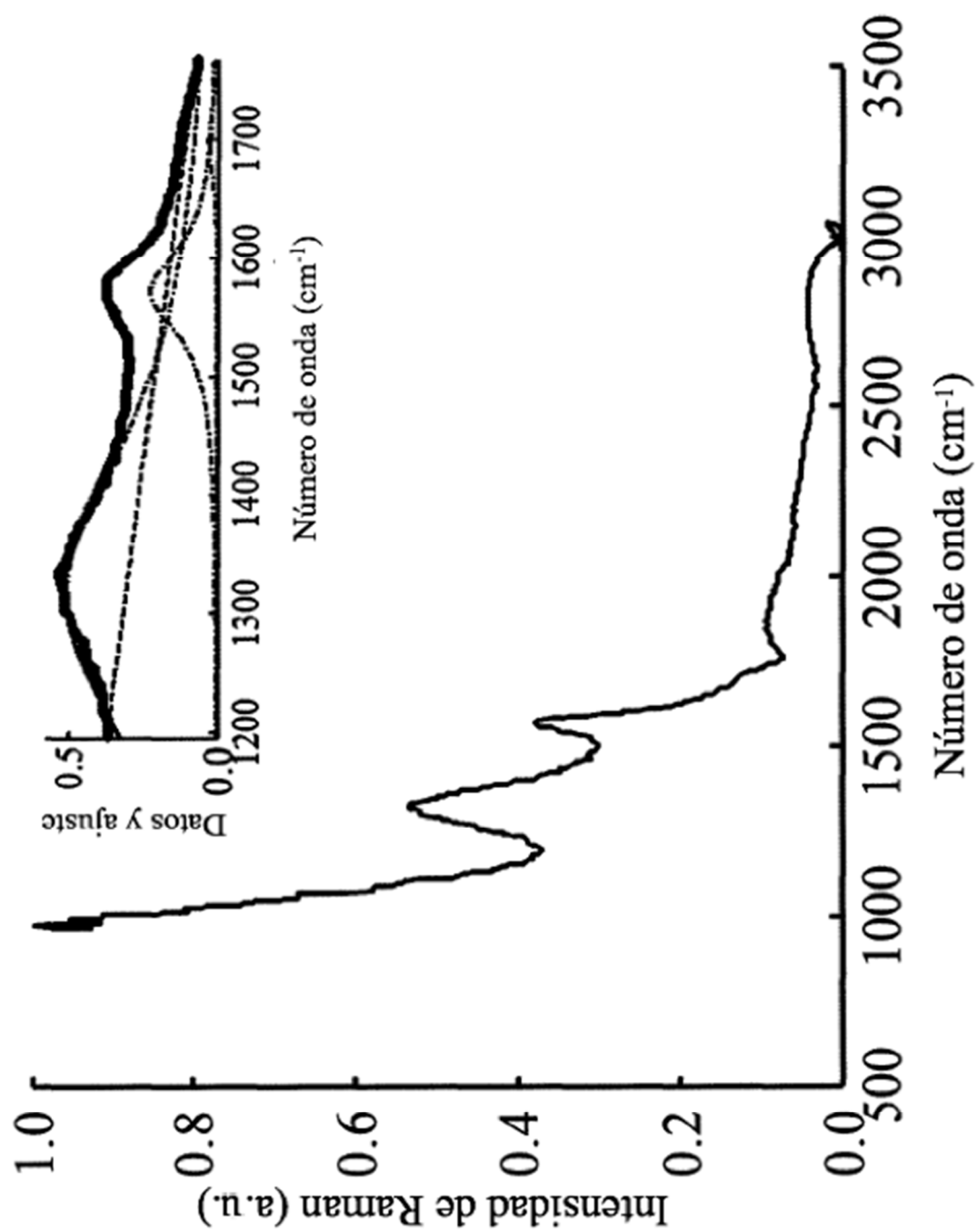


Figura 27.

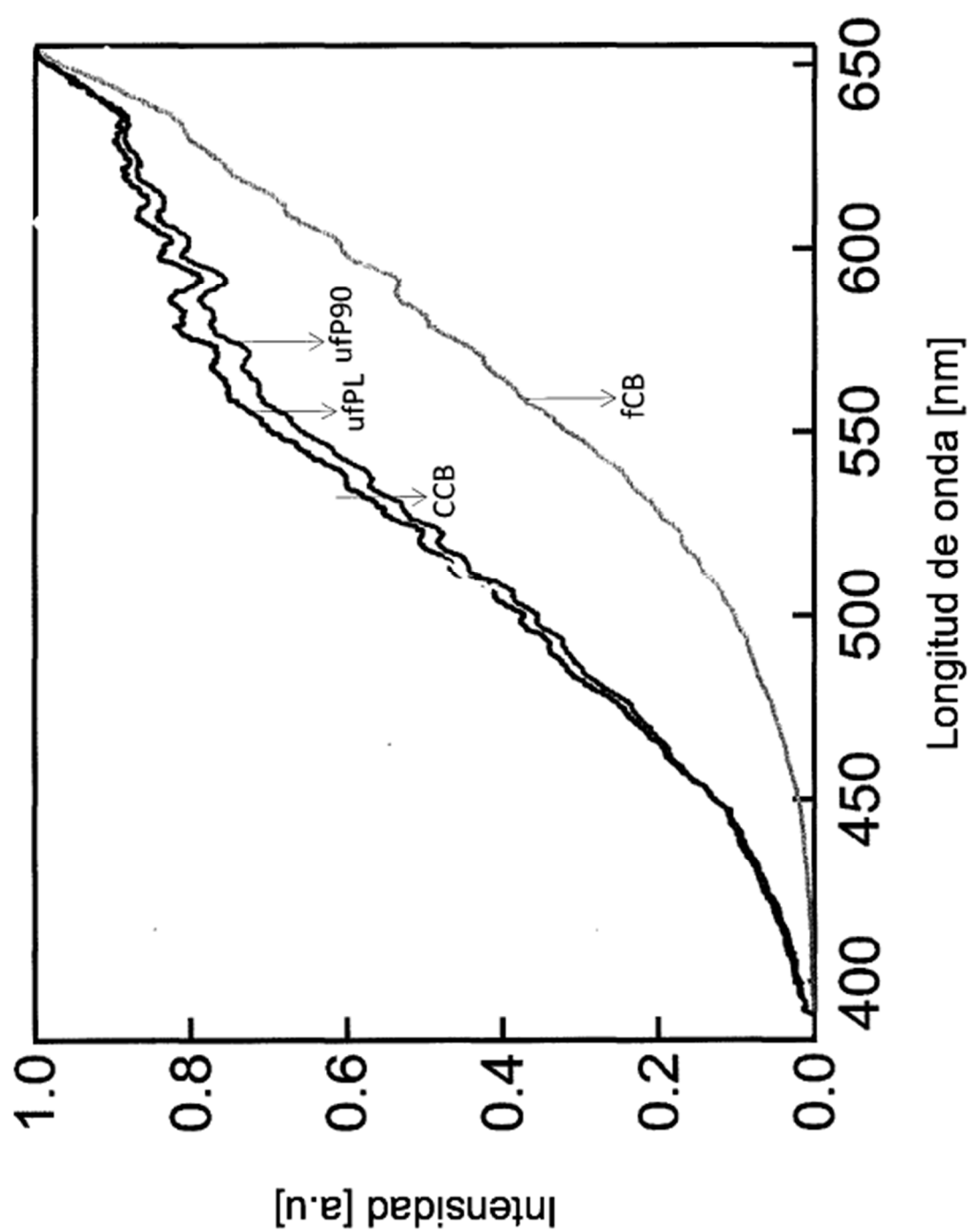


Figura 28.

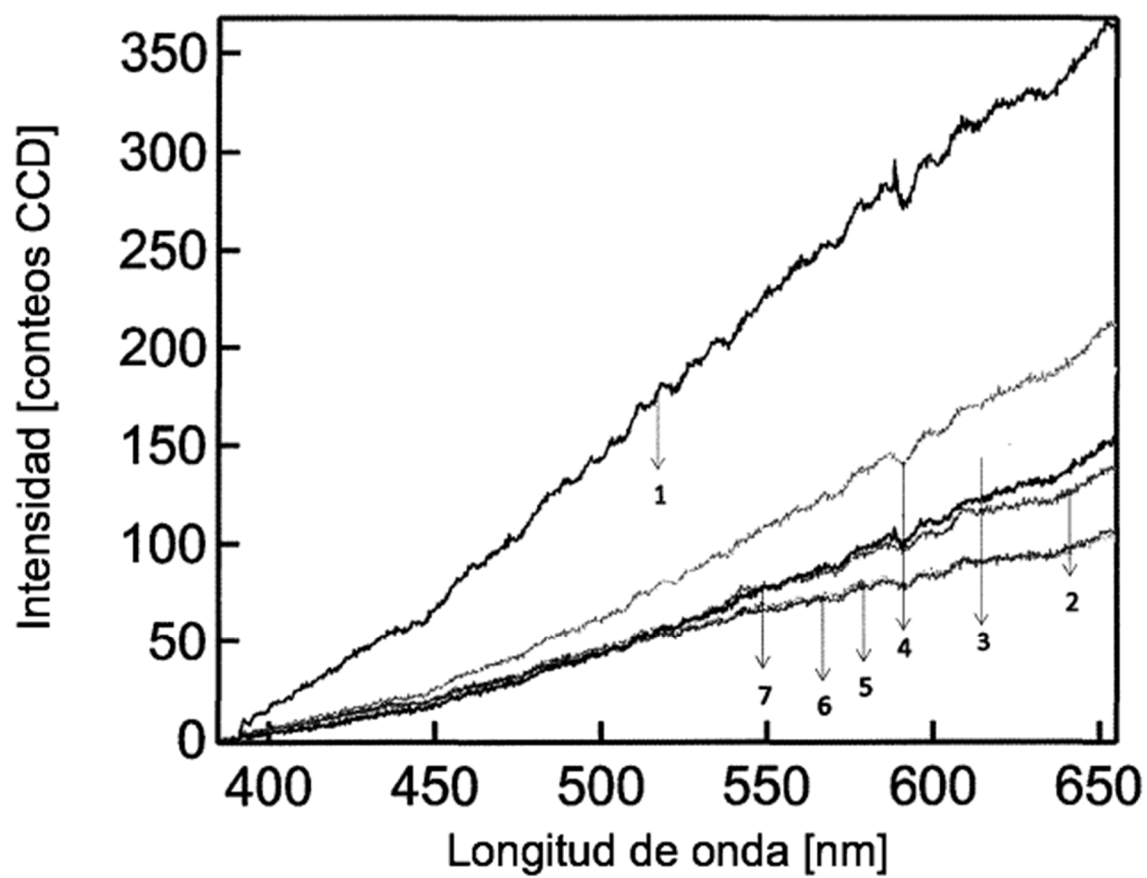


Figura 29.

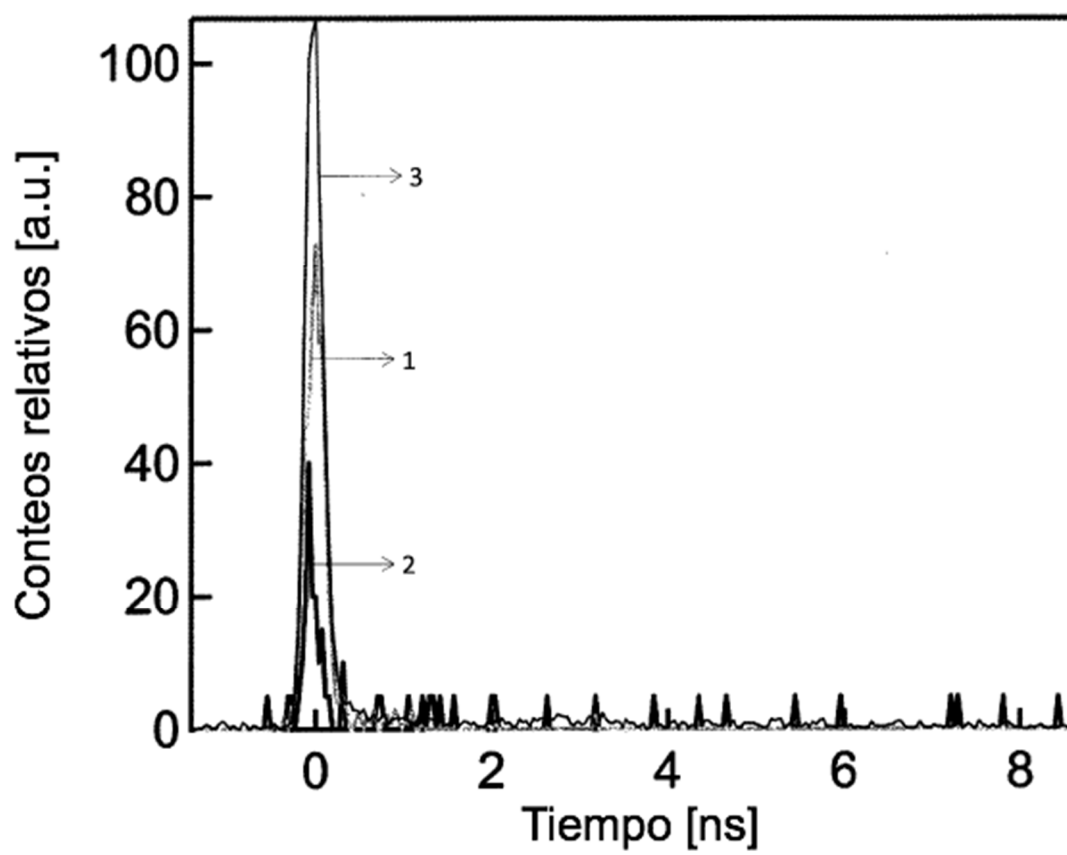


Figura 30.

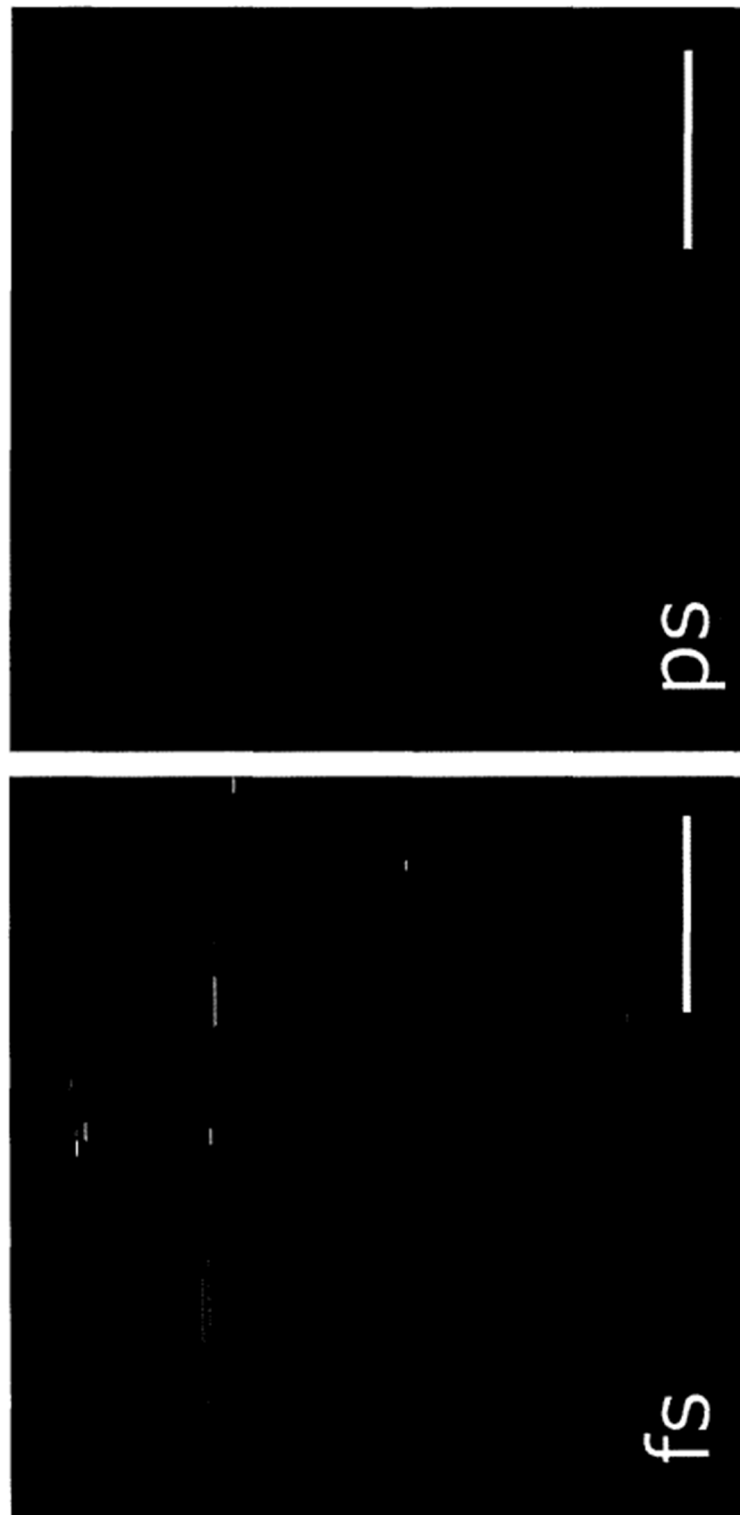


Figura 31.

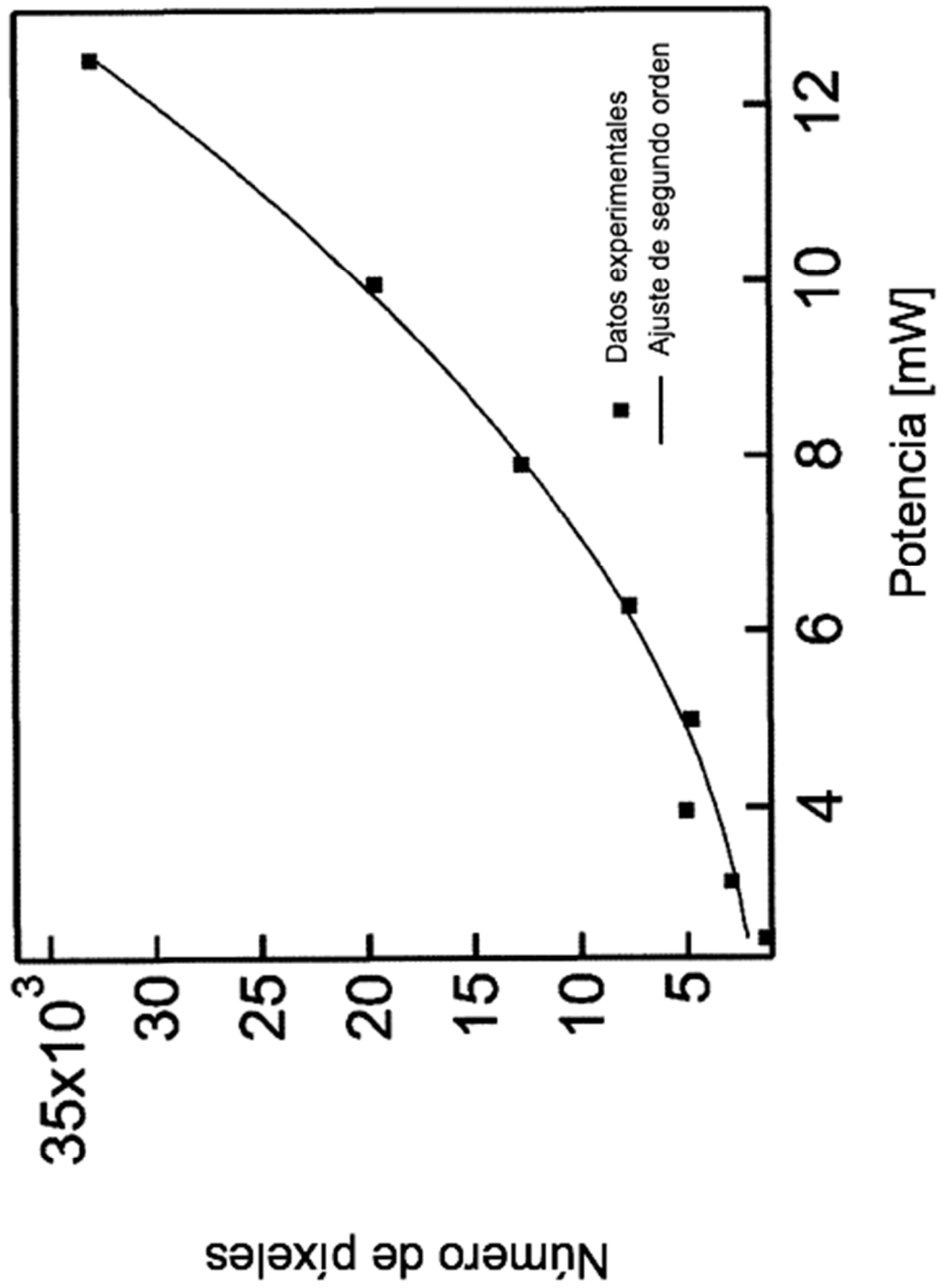


Figura 32.

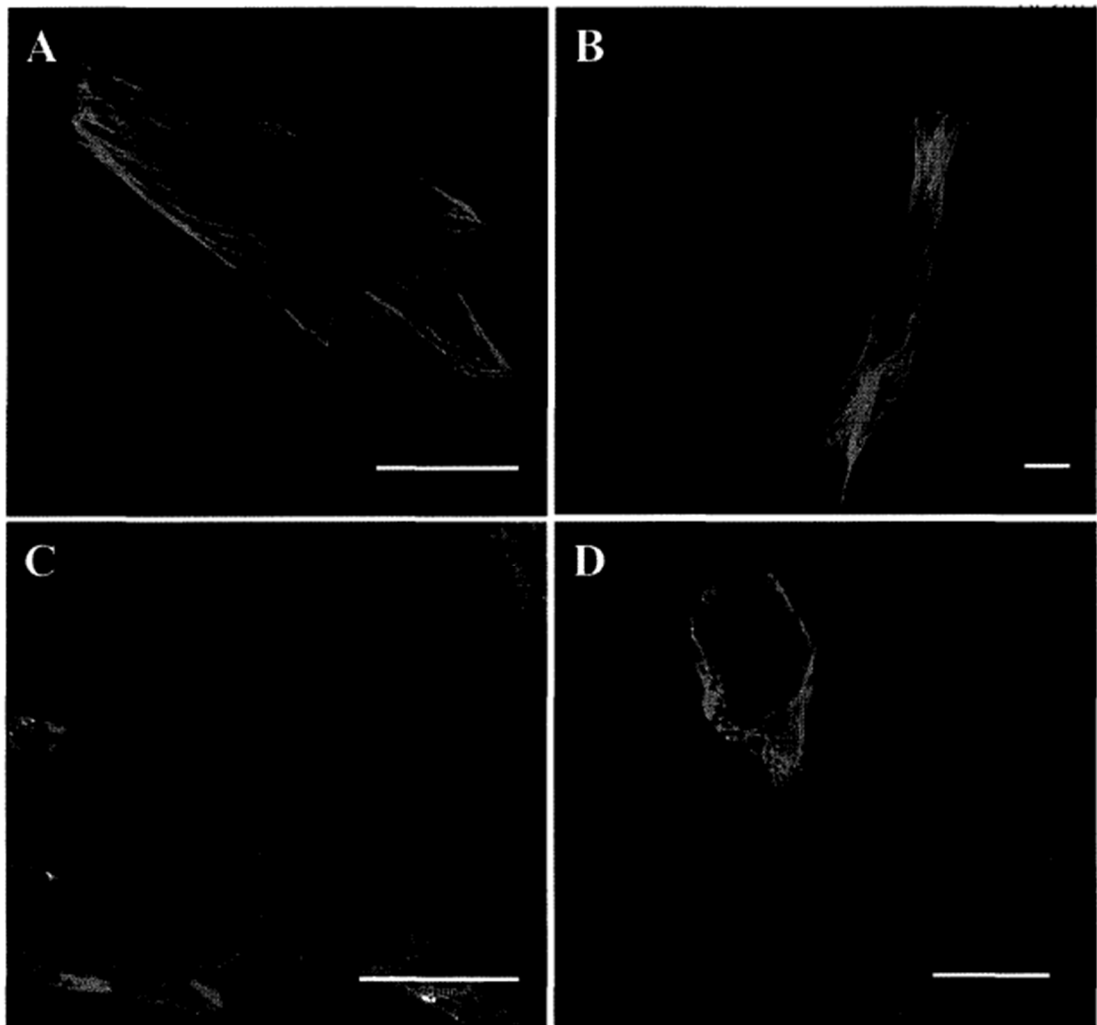


Figura 33.