



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 342 706**

② Número de solicitud: 200803696

⑤ Int. Cl.:
H01J 37/20 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **24.12.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2010**

Fecha de la concesión: **13.04.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **27.04.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
27.04.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Fortuño Alós, José Manuel y
Segura i Noguera, María del Mar**

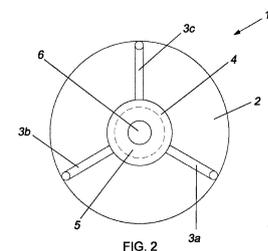
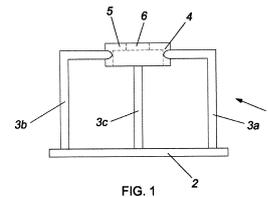
⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Portamuestras para microanálisis de rayos X con microscopía electrónica de barrido.**

㉑ Resumen:

Portamuestras para microanálisis de rayos X con microscopía electrónica de barrido.

La invención describe un nuevo portamuestras (1) para microanálisis de rayos X que evita interferencias entre las señales de la muestra y las señales del propio portamuestras (1), y que comprende una base (2) sobre la que se apoyan unas columnas (3a, 3b, 3c) que soportan una estructura (4) de soporte, preferentemente un cilindro cuyo extremo superior tiene una tapa (5) con un orificio central (6) sobre la que se coloca una rejilla que contiene la muestra.



ES 2 342 706 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Portamuestras para microanálisis de rayos X con microscopía electrónica de barrido.

5 **Objeto de la invención**

El objeto principal de la presente invención es un nuevo portamuestras para microanálisis de rayos X que evita interferencias entre las señales de la muestra y las señales del propio portamuestras. El portamuestras de la invención es especialmente útil para el análisis de muestras biológicas o de pequeño espesor.

10 **Antecedentes de la invención**

El término microanálisis en microscopía electrónica se refiere a la identificación y análisis químico de volúmenes pequeños de materia. Con el uso del microanálisis de rayos X (XRMA) es posible obtener el contenido químico cualitativamente (elementos atómicos presentes a la muestra) y cuantitativamente (en masa), utilizando detectores de rayos X acoplados a microscopios electrónicos.

En sus inicios, el microanálisis se aplicaba al análisis de material de origen geológico para posteriormente utilizarse en biología con muestras de células en cultivo. El cambio de naturaleza de la muestra no es trivial, ya que normalmente en geología se analizan minerales con un número atómico (Z) elevado y alta densidad, mientras que las muestras biológicas se caracterizan por ser poco densas, tener bajos Z (al estar básicamente constituidas por C, H, O, N, P y S), y ser muy delgadas (esta técnica se aplica básicamente al estudio del contenido elemental de células).

El XRMA puede llevarse a cabo en dos tipos de microscopios electrónicos: barrido (MEB o SEM, según sus siglas en inglés) y transmisión (MET o TEM, según sus siglas en inglés). También en un microscopio de transmisión-barrido (STEM, en su denominación inglesa). La preparación de las muestras es muy diferente en cada tipo de microscopio, ya que los objetivos que persiguen también lo son. El microanálisis de rayos X se puede realizar con dos espectrómetros: espectrómetro de dispersión de longitud de onda (WDS, según sus siglas inglesas) y espectrómetro de dispersión de energías (EDS, según sus siglas en inglés). Este último es el que se utiliza generalmente en los SEM. En un SEM se pretende estudiar la morfología superficial (topografía) de la muestra, por lo tanto ésta se coloca sobre un apoyo rígido, los más comunes de 12 a 15 mm de diámetro, y se recubre con algún metal (C, Au, Au-Pd) para dar conductividad a la muestra y aumentar la resolución de la imagen. Las muestras son relativamente gruesas, apareciendo fenómenos de absorción, dispersión y fluorescencia de rayos X que complican la identificación y cuantificación de los elementos presentes. Para cuantificar espectros obtenidos con análisis en SEM (denominados en inglés "bulk analysis"), normalmente se aplica la corrección ZAF.

En un microscopio TEM se pueden distinguir estructuras dentro de la muestra, a partir de diferencias en la densidad de los electrones que llegan al detector después de atravesar la muestra. Ésta debe ser tan delgada como se pueda, y se coloca sobre una rejilla, normalmente de Al, de 3 mm de diámetro. Si se asume que la capa analizada es suficientemente delgada, entonces los efectos de absorción y fluorescencia de rayos X se pueden desestimar, de manera que la intensidad de los rayos X emitidos y de los rayos X que abandonan la muestra es la misma. Este es el criterio para el análisis de capa fina ("*thin film*"), que se puede llevar a cabo en TEM, pero no en SEM.

Las metodologías existentes hasta el presente para el análisis de células individuales utilizando SEM - EDS (por ejemplo, Sigee y Levado, 2000, "*Cell surface elemental composition of Microcystis aeruginosa: high-Si and low-Si subpopulations within the water column of a eutrophic lake*", J. Plankton Res. 22 (11): 2137-2153) no son válidas cuando se trata de medir elementos ligeros (C, N y O), ya que las células son colocadas en filtros de policarbonato. Al contener el filtro mayor cantidad de C y O que las células, la señal proveniente del filtro es mucho más importante que la de la célula, quedando ésta muy diluida. La contribución del filtro también sería muy importante en el caso de utilizar filtros de otros materiales, como por ejemplo de fibra de vidrio (alta contribución en Si), o de plata (algunos picos característicos de la plata (Ag) interfieren con los elementos ligeros). Además, la densidad del volumen analizado aumenta, afectando tanto al análisis como a la forma del espectro de microanálisis resultante.

La utilización de otros soportes que normalmente se utilizan en las observaciones por SEM, como soporte de Al, de Cu-Zn, o de Be, también presentan inconvenientes en el análisis de células individuales:

- Oxidación del soporte (las células se encuentran en un medio líquido).
- Aparición de picos característicos y contribución en radiación de fondo por parte de los elementos que conforman el soporte.
- Toxicidad de algunos soportes (Be).

Otros investigadores han creado un soporte de boro (Choël *et al.*, 2005, "*Quantitative determination of low-Z elements in single atmospheric particles on boron substrates by automated scanning electron microscopy-energy-dispersive X-ray spectrometry*", Anal. Chem. 77:5686-5692), que con las condiciones adecuadas del detector puede actuar como el soporte de Berilio, es decir, sin aportar picos característicos, pero participando en la radiación continua, absor-

ción y dispersión de rayos X. Teniendo en cuenta que el detector de rayos X funciona en condiciones óptimas cuando recibe como máximo 1000 cuentas (rayos X)/s, resulta importante evitar tanto los picos característicos que contaminen la muestra (provenientes de las chapas y filtros), como picos de radiación continua que no provengan de la muestra que nos interesa analizar. Eso es especialmente importante cuando la muestra contiene algún elemento de interés en muy baja concentración. Una aproximación a la técnica resultante de la utilización de este nuevo portamuestras se halla en un estudio previo de Segura-Noguera (“Relació entre la distribució de nutrients i oxígen dissolt i la composició elemental de fitoplàncton a la Mar Catalana” (N-O Mar Mediterrània). Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de Catalunya, 287 pp. 2007)

10 Descripción de la invención

El objetivo de la presente invención es un portamuestras para microanálisis de rayos X con microscopía electrónica de barrido que permite conseguir espectros que contienen solamente los elementos de interés de la muestra, sin interferencias causadas por el material del soporte. Este portamuestras es especialmente útil en el análisis de muestras muy finas o muestras biológicas, aunque también se puede emplear para el análisis de partículas ambientales, minerales, cristales, y en general cualquier partícula u organismo o material que por su pequeño grosor sea atravesado por el haz de electrones del microscopio electrónico de barrido en el momento de su análisis. Además, el nuevo portamuestras permite utilizar las correcciones que se utilizan habitualmente en la microscopía electrónica de transmisión, ya que los fenómenos de absorción y fluorescencia se pueden despreciar, como se ha explicado en el apartado anterior.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el portamuestras comprende una base sobre la que descansan unas columnas de apoyo que soportan una estructura de soporte para sostener la rejilla sobre la que se coloca la muestra.

La estructura de soporte puede ser de cualquier forma, siempre que sostenga la rejilla de un modo adecuado para colocar la muestra sobre ella. Por ejemplo, la estructura de soporte podría estar constituida simplemente por una o varias ranuras dispuestas en el extremo superior de las columnas de apoyo para sujetar la rejilla, o bien por estructuras de forma cuadrada, triangular u otras. Sin embargo, de acuerdo con una realización particular de la invención, la estructura de soporte tiene una forma circular cuyo extremo superior está cerrado por una tapa que tiene un orificio central, y que sirve de apoyo para la rejilla. En realizaciones preferidas de la invención, el diámetro externo de esta estructura de soporte circular es de entre 11 mm. y 20 mm., mientras que el diámetro del orificio central de la tapa es de entre 7 mm. y 10 mm. Preferentemente, la estructura de soporte circular es un cilindro hueco cuya altura está entre 3 mm. y 6 mm.

La rejilla se fija a la tapa, preferiblemente empleando unos medios de sujeción, de modo que la muestra queda en el centro del orificio central de la tapa. Los medios de fijación pueden ser de cualquier tipo, como por ejemplo lengüetas, pinzas, ranuras, piezas en forma de tapón agujereado, u otros cualesquiera conocidos en la técnica.

La base puede tener cualquier forma, siempre que cumpla el objetivo de proporcionar un apoyo estable al portamuestras, aunque en una realización particular de la invención se trata de una base circular con un diámetro de entre 35 mm. y 45 mm., y preferiblemente con un espesor de entre 3 mm. y 6 mm.

Las columnas de apoyo pueden ser cualquier número y tener cualquier forma siempre que sostengan el cilindro superior por encima de la base en una posición adecuada para el análisis de la muestra mediante un microscopio electrónico. En una realización particular de la invención se utilizan tres columnas cilíndricas de entre 1,5 mm. y 5 mm. que se apoyan en la periferia de la base y se doblan en ángulo recto para sostener el cilindro superior. Preferiblemente, su altura es de entre 23 mm. y 27 mm.

El portamuestras descrito puede estar fabricado en cualquier material, aunque es recomendable que dicho material no coincida con ninguno de los materiales presentes en la muestra a analizar. En cualquier caso, y de acuerdo con una realización preferida de la invención, el material del portamuestras es aluminio.

Aunque no se describe específicamente en el presente documento, se entiende que el portamuestras de la invención comprende además un medio de acoplamiento adecuado para su fijación al microscopio electrónico que se vaya a emplear.

Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Muestra un alzado del portamuestras de la invención.

Figura 2.- Muestra una planta del portamuestras de la invención.

Realización preferente de la invención

Se describe a continuación un ejemplo de un portamuestras (1) de acuerdo con la invención haciendo referencia a las figuras adjuntas.

5 En este ejemplo, el portamuestras (1) comprende una base (2) de aluminio de 40 mm. de diámetro y 5 mm. de espesor, y que además tiene una rosca central de 4 mm. de diámetro (no mostrada en las figuras) para su fijación a soportes de microscopios electrónicos de barrido de la marca Hitachi. Sobre la base (2) hay tres columnas (3a, 3b, 3c) de aluminio, equidistantes, de 4 mm. de diámetro y 24 mm. de altura. A esa altura las columnas (3a, 3b, 3c) se doblan en ángulo recto hacia el centro del portamuestras (1) para sujetar la estructura (4) de soporte, que en este ejemplo es un cilindro sobre el cual se dispone una rejilla de 10 mm de diámetro (no mostrada en las figuras).

15 El cilindro, también de aluminio, tiene un diámetro externo de 15 mm. y una altura de 6 mm, estando cerrado en su extremo superior por una tapa (5) con un orificio central (6) de 9 mm. de diámetro. La rejilla que contiene las muestras queda sujeta a la tapa (5) mediante unos medios de fijación, que en este ejemplo comprenden un tapón agujereado de aluminio (no mostrada en las figuras) que encaja sobre la tapa (5). Las dimensiones del tapón agujereado de este ejemplo son: diámetro exterior 16 mm., diámetro interior 9 mm. y altura 3 mm.

20

25

30

35

40

45

50

55

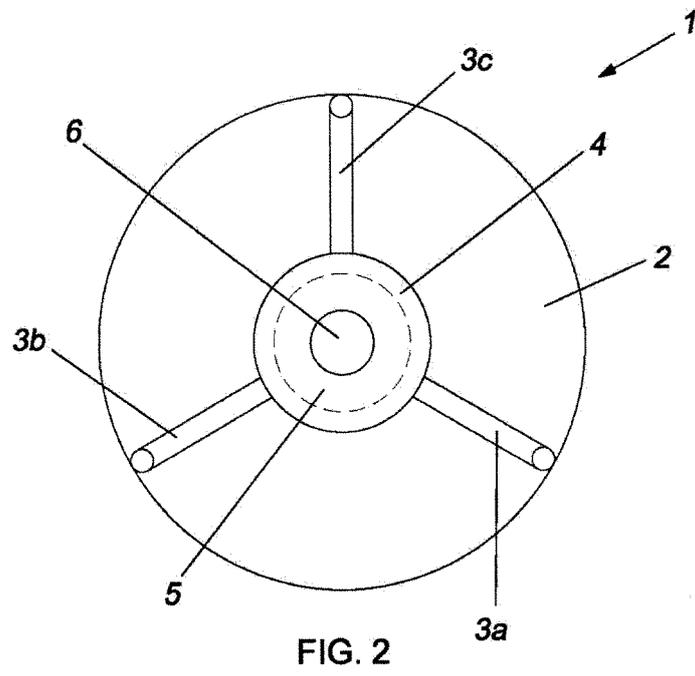
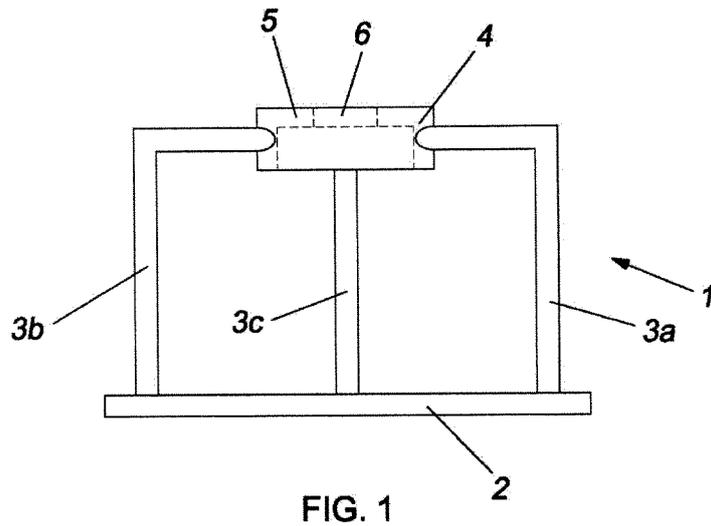
60

65

ES 2 342 706 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Portamuestras (1) para el microanálisis de rayos X con microscopía electrónica de barrido, **caracterizado** porque comprende una base (2) sobre la que descansan unas columnas (3a, 3b, 3c) que soportan una estructura (4) de soporte que sostiene una rejilla sobre la que se dispone la muestra.
- 10 2. Portamuestras (1) de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la estructura (4) de soporte tiene forma circular cuyo extremo superior tiene una tapa (5) con un orificio central (6).
- 15 3. Portamuestras (1) de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque el diámetro externo de la estructura (4) de soporte circular es de entre 11 mm. y 20 mm.
- 20 4. Portamuestras (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-3, **caracterizado** porque el diámetro del orificio central (6) de la tapa (5) es de entre 7 mm. y 10 mm.
- 25 5. Portamuestras (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, **caracterizado** porque la estructura (4) de soporte circular es un cilindro hueco.
- 30 6. Portamuestras (1) de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** porque el cilindro tiene una altura de entre 3 mm. y 6 mm.
- 35 7. Portamuestras (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la base (2) es circular con un diámetro de entre 35 mm. y 45 mm.
- 40 8. Portamuestras (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la base (2) tiene un espesor de entre 3 mm. y 6 mm.
- 45 9. Portamuestras (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las columnas (3a, 3b, 3c) tienen entre 1,50 mm. y 5 mm. de diámetro.
- 50 10. Portamuestras (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las columnas (3a, 3b, 3c) tienen entre 23 mm. y 27 mm. de altura.
- 55 11. Portamuestras (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque está hecho de aluminio.
- 60
- 65





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 706

② Nº de solicitud: 200803696

③ Fecha de presentación de la solicitud: **24.12.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **H01J 37/20** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | SEGURA NOGUERA, Mariona. Relació entre la distribució de nutrients i oxigen dissolt i la composició elemental del fitoplàncton a la Mar Catalana (N-O Mar Mediterrània). [en línea] Tesis doctoral defendida el 19-10-2007. [recuperado el 2010-05-06] Recuperado en Internet: la información bibliográfica en <URL:http://www.tesisenred.net/TDX-0416108-104002/#documents> y el texto de la tesis en <URL:http://www.tesisenred.net/ TESIS_UPC/AVAILABLE/TDX-0416108-104002// 02_seguraNoguera_captiol_2_6_conclusions.pdf> Capítulo 4, páginas 124-127 y figura 4.6. ISBN: B.31935-2008/978-84-691-3936-3 | 1-11 |
| A | WO 2006021961 A2 (QUANTOMIX LTD) 02.03.2006, página 6, línea 12 - página 7, línea 9; figura 1B. | 2,5,7 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.06.2010

Examinador

A. Figuera González

Página

1/4

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

H01J, G01N, G01Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTEN, internet

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2010

Declaración

| | | | |
|--|------------------|------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | 2-11 | SÍ |
| | Reivindicaciones | 1 | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | | SÍ |
| | Reivindicaciones | 1-11 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | SEGURA NOGUERA, Mariona. Relació entre la distribució de nutrients i oxigen dissolt i la composició elemental del fitoplàncton a la Mar Catalana (N-O Mar Mediterrània). | 19-10-2007 |
| D02 | WO 2006021961 A2 (QUANTOMIX LTD) | 02-03-2006 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

REIVINDICACIÓN 1.

En el documento D01 se describe un portamuestras para el microanálisis de rayos X con microscopía electrónica de barrido. Se ha montado una estructura de soporte de una rejilla sobre la que se dispone una muestra apoyada en tres columnas que descansan sobre una base. Véase documento D01, página 125, segundo párrafo después de la figura 4.5, página 126 último párrafo a página 127 párrafo anterior a la figura 4.6 y figura 4.6.

Así pues el objeto de la reivindicación 1 con todas sus características técnicas ha sido divulgado en el documento D01 por lo que la reivindicación 1 carece de novedad de acuerdo con el artículo 4 de la Ley de Patentes.

REIVINDICACIONES 2 y 5.

Se considera que el documento D01 es el documento del estado de la técnica más próximo al objeto de la reivindicación 2.

En el documento D01 la estructura de soporte de la rejilla portamuestras es un triángulo formado por tres alambres mientras que en la reivindicación 2 es una pieza que tiene una forma circular cuyo extremo superior tiene una tapa con un orificio central y en la reivindicación 5 se especifica que se trata de un cilindro hueco.

Así pues la diferencia entre el documento D01 y el objeto de las reivindicaciones 2 y 5 es la configuración del soporte de la rejilla portamuestras.

Pero el utilizar una estructura circular con forma de cilindro para soportar una rejilla circular es una alternativa de diseño del conocimiento común para el experto en la materia tal y como se ilustra en el documento D02 en el que se describe el uso de una pieza de forma circular con un anillo 116 con una apertura sobre la que se sitúa un elemento 112 de soporte de una rejilla 114 en un recipiente de muestra compatible con un microscopio electrónico de barrido (SEM). Véase documento D02, página 6, línea 12 a página 7, línea 9 y figura 1B.