

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 058**

51 Int. Cl.:

G01N 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2008 E 08746022 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2142905**

54 Título: **Normalización de biomarcadores**

30 Prioridad:

16.04.2007 US 912129 P

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

28.06.2013

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

SULLIVAN, BENJAMIN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 410 058 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

Normalización de biomarcadores

5 ANTECEDENTES

[0001] 1. Campo de la invención

[0002] El campo de la invención está relacionado de forma general con mediciones de la osmolaridad, y más concretamente con sistemas y procedimientos para calibrar dispositivos que miden la osmolaridad de la película lagrimal.

[0003] 2. Antecedentes

[0004] Las lágrimas desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad de la superficie ocular, la protección contra ataques microbianos y la conservación de la agudeza visual. A su vez, estas funciones dependen de forma crucial de la composición y estabilidad de la estructura de la película lagrimal, la cual incluye una capa de mucina subyacente, un componente acuoso central y una capa lipídica suprayacente. La rotura, deficiencia o ausencia de la película lagrimal puede afectar gravemente al ojo. Si no se tratan con sustitutos lagrimales artificiales o mediante una terapia de conservación de la película lagrimal, estos trastornos pueden causar una desecación incurable del epitelio corneal, ulceración y perforación de la córnea, una mayor incidencia de enfermedades infecciosas y, finalmente, una deficiencia visual pronunciada y ceguera.

[0005] La queratoconjuntivitis seca (QCS), u "ojo seco", es un estado en el que uno o más de los componentes estructurales antes expuestos de la película lagrimal está presente en un volumen insuficiente o está desequilibrado de otro modo con respecto a los demás componentes. Se sabe que la tonicidad u osmolaridad del líquido de las lágrimas aumenta en pacientes con QCS. La QCS está asociada a estados que afectan a la salud general del organismo, tales como el síndrome de Sjogren, el envejecimiento y la deficiencia androgénica. Por lo tanto, la osmolaridad de una película lagrimal puede ser un indicador sensible y específico para el diagnóstico de la QCS y de otros estados.

[0006] La osmolaridad de un líquido de muestra (por ejemplo, una lágrima) se puede determinar mediante una técnica *ex vivo* denominada "depresión del punto de congelación", en la que los solutos o iones en un disolvente (es decir, agua) provocan una disminución del punto de congelación del líquido con respecto al que tendría éste sin los iones. En el análisis de la depresión del punto de congelación, el punto de congelación del líquido de muestra ionizado se halla detectando la temperatura a la que una cantidad de muestra (típicamente del orden de aproximadamente varios mililitros) comienza a congelarse en un recipiente (por ejemplo, un tubo). Para medir el punto de congelación se recoge un volumen del líquido de muestra en un recipiente, tal como un tubo. A continuación, se sumerge una sonda de temperatura en el líquido de muestra y el recipiente se pone en contacto con un baño de congelación o un dispositivo refrigerador de Peltier. La muestra se agita de forma continua para alcanzar un estado de líquido sobreenfriado por debajo de su punto de congelación. Tras una inducción mecánica la muestra solidifica, subiendo a su punto de congelación debido al calor termodinámico de fusión. La desviación del punto de congelación de la muestra de 0°C es proporcional al nivel de solutos presente en el líquido de muestra. Este tipo de dispositivo de medición se denomina a veces osmómetro.

[0007] Actualmente, las mediciones de la depresión del punto de congelación se realizan *ex vivo* extrayendo muestras de lágrimas del ojo mediante una micropipeta o un tubo capilar y midiendo la depresión del punto de congelación que se obtiene como resultado del incremento de la osmolaridad. Sin embargo, estas mediciones *ex vivo* con frecuencia están plagadas de dificultades. Por ejemplo, para realizar el análisis de la depresión del punto de congelación de la muestra de lágrima se ha de recoger un volumen relativamente grande, típicamente del orden de 20 microlitros (µl), de una película lagrimal. Puesto que de un paciente con QCS no se pueden obtener más que aproximadamente 10 a 100 nanolitros (nl) de muestra de lágrima cada vez, la recogida de cantidades suficientes de líquido para las técnicas *ex vivo* convencionales requiere que el médico induzca un lagrimeo reflejo en el paciente. El lagrimeo reflejo es provocado por una irritación intensa o prolongada de la superficie ocular, parecida a cuando entra una gran cantidad de suciedad en el ojo. Las lágrimas reflejo están más diluidas, es decir, presentan menos solutos iónicos que las lágrimas que se encuentran normalmente en el ojo. Cualquier dilución de la película lagrimal invalida la capacidad diagnóstica de un ensayo de osmolaridad para el ojo seco y, por lo tanto, no permite el uso de los procedimientos *ex vivo* actualmente disponibles en un ámbito clínico.

- [0008]** Una técnica *ex vivo* similar es la osmometría de presión de vapor, en la que se coloca un pequeño trozo de papel de filtro circular debajo del párpado de un paciente hasta que se haya absorbido suficiente líquido. El disco de papel de filtro se introduce en una cámara hermética, después de lo cual un sensor de temperatura enfriado mide la condensación de vapor sobre su superficie. Finalmente, el sensor de temperatura se eleva al punto de rocío de la muestra. La reducción del punto de rocío proporcional al agua se convierte después en osmolaridad. Debido a la inducción del lagrimeo reflejo y al gran volumen requerido para los osmómetros de presión de vapor existentes, éstos son actualmente poco prácticos para la determinación del ojo seco.
- [0009]** El osmómetro nanolitro Clifton (disponible en Clifton Technical Physics of Hartford, N.Y., EE.UU.) se ha usado extensamente en los laboratorios para cuantificar las concentraciones de solutos en pacientes con QCS, pero la máquina requiere mucha experiencia para manejarla. Generalmente necesita muchas horas de calibración y un técnico experto con el fin de generar datos aceptables. El osmómetro nanolitro Clifton es asimismo voluminoso y relativamente caro. Estas características quitan seriamente valor a su uso como osmómetro clínico.
- [0010]** Al contrario que las técnicas *ex vivo*, que miden la osmolaridad de muestras de lágrima extraídas de la superficie ocular, en una técnica *in vivo* en la que se intentó medir la osmolaridad directamente en la superficie ocular se usó una pareja flexible de electrodos que se colocaron directamente debajo del párpado del paciente. Los electrodos se enchufaron después a un medidor LCR para determinar la conductividad del líquido que los rodeaba. Aunque se sabe desde hace tiempo que la conductividad está relacionada directamente con la concentración iónica y, por tanto, con la osmolaridad de las soluciones, la colocación del sensor debajo del párpado durante medio minuto probablemente indujera un lagrimeo reflejo. Además, estos electrodos eran difíciles de fabricar y representaban riesgos crecientes para la salud del paciente en comparación con la simple recogida de lágrimas con un capilar. El documento US 2006/0107729 muestra otro ejemplo de un sistema para medir la osmolaridad lagrimal.
- [0011]** De la discusión anterior se desprende que las técnicas actuales para la medición de la osmolaridad no están disponibles en el ámbito clínico, ni pueden alcanzar los volúmenes necesarios para pacientes que sufren de ojo seco. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar una medición de la osmolaridad mejorada, clínicamente viable y a escala de nanolitros. La presente invención satisface esta necesidad. Las lágrimas desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad de la superficie ocular, la protección contra ataques microbianos y la conservación de la agudeza visual. A su vez, estas funciones dependen de forma crucial de la composición y estabilidad de la estructura de la película lagrimal, la cual incluye una capa de mucina subyacente, un componente acuoso central y una capa lipídica suprayacente. La rotura, deficiencia o ausencia de la película lagrimal puede afectar gravemente al ojo.
- 35 RESUMEN
- [0012]** De acuerdo con la invención, se mide una muestra de líquido con un sistema de medición de la película lagrimal como se define en la reivindicación 1.
- [0013]** Estas y otras características, aspectos y realizaciones de la invención se describen más adelante en la sección titulada "Descripción detallada".
- BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS
- [0014]** Las características, aspectos y realizaciones de la invención se describen en combinación con los dibujos adjuntos, en los que:
- [0015]** La figura 1 ilustra un chip receptor de muestras del tamaño de alícuota para medir la osmolaridad de un líquido de muestra;
- [0016]** la figura 2 ilustra una realización alternativa de un chip receptor de muestras que incluye una región de circuito con un conjunto de electrodos impresos mediante técnicas fotolitográficas;
- [0017]** la figura 3 ilustra otra realización alternativa del chip de la figura 1, en la que una región de circuito incluye electrodos impresos dispuestos en una pluralidad de círculos concéntricos;
- [0018]** la figura 4 es una vista superior del chip mostrado en la figura 2;
- [0019]** la figura 5 es una vista superior del chip mostrado en la figura 3;

- [0020] la figura 6 es un diagrama esquemático de un sistema de medición de la osmolaridad configurado de acuerdo con la presente invención;
- 5 [0021] la figura 7 es una vista en perspectiva de un sistema de medición de la osmolaridad de películas lagrimales construido de acuerdo con la presente invención;
- [0022] la figura 8 es un corte lateral del chip receptor de muestras que muestra el orificio en la cápsula exterior;
- 10 [0023] la figura 9 es una curva de calibración que relaciona el contenido de sodio del líquido de muestra con la conductividad eléctrica;
- [0024] la figura 10 ilustra una unidad de base articulada del osmómetro en la que se usan los chips receptores de muestras descritos en las figuras 1 a 5;
- 15 [0025] la figura 11 ilustra una configuración de la tarjeta sonda para el chip receptor de muestras y la unidad de procesamiento;
- [0026] la figura 12 es un diagrama de flujo que describe un ejemplo de la técnica de medición de la osmolaridad de acuerdo con la invención;
- 20 [0027] la figura 13 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para calibrar un sistema de medición de la osmolaridad de acuerdo con otro ejemplo de realización de la invención;
- 25 [0028] la figura 14 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para calibrar un sistema de medición de la osmolaridad de acuerdo con otro ejemplo de realización de la invención;
- [0029] la figura 15 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para calibrar un sistema de medición de la osmolaridad de acuerdo con otro ejemplo de realización de la invención;
- 30 [0030] la figura 16 es una imagen que muestra los cristales de sal residuales sobre un conjunto de microelectrodos;
- [0031] la figura 17 es un gráfico que ilustra una respuesta típica cuando un líquido de muestra se introduce en un conjunto de electrodos;
- 35 [0032] la figura 18 es un gráfico que ilustra una respuesta cuando un líquido de muestra se introduce en un conjunto de microelectrodos que contiene sal residual; y
- 40 [0033] la figura 19 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para calibrar un sistema de medición de la osmolaridad de acuerdo con otro ejemplo de realización de la invención.
- [0034] La figura 20 es un diagrama de flujo que ilustra la normalización de biomarcadores de acuerdo con la invención.
- 45 [0035] La figura 21 es una vista en planta de un sustrato receptor en el que la osmolaridad está multiplexada en el espacio con la detección de biomarcadores.
- [0036] La figura 22 es una vista detallada del sustrato receptor de la figura 21 que muestra la disposición de electrodos en la región de muestras.
- 50

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- [0037] Se describen ejemplos de realización para la medición de la osmolaridad en un volumen alícuota de un líquido de muestra (por ejemplo, película lagrimal, sudor, sangre u otros líquidos). Los ejemplos de realización están configurados para ser relativamente rápidos, no invasivos, económicos y fáciles de usar, con un daño de riesgo mínimo para el paciente. Se pueden obtener mediciones precisas con volúmenes de un líquido de muestra de tan solo unos nanolitros. Por ejemplo, un dispositivo de medición configurado de acuerdo con la invención permite medir la osmolaridad con no más de 200 μ l de líquido de muestra, y típicamente se pueden medir con éxito volúmenes

mucho más pequeños. En una realización, descrita adicionalmente más adelante, la precisión de la medición de la osmolaridad no está comprometida por variaciones en el volumen del líquido de muestra recogido, de manera que la medición de la osmolaridad es sustancialmente independiente del volumen recogido. El líquido de muestra puede incluir película lagrimal, sudor, sangre u otros líquidos corporales. Cabe señalar, no obstante, que el líquido de muestra puede comprender otros líquidos, tales como leche u otras bebidas.

[0038] La figura 1 ilustra un ejemplo de realización de un chip de osmolaridad 100 que se puede usar para medir la osmolaridad de un líquido de muestra 102, tal como una muestra de película lagrimal. En la realización de la figura 1, el chip 100 incluye un sustrato 104 con una región de muestras que presenta electrodos sensores 108, 109 y conexiones de circuito 110 impresas en el sustrato. Los electrodos y las conexiones de circuito se imprimen preferentemente usando técnicas fotolitográficas conocidas. Por ejemplo, las técnicas actuales permiten que los electrodos 108, 109 presenten un diámetro comprendido en el intervalo de aproximadamente uno (1) a ochenta (80) micrómetros y estén espaciados lo suficiente como para que no exista ninguna vía conductora en ausencia de líquido de muestra. Sin embargo, las técnicas actualmente disponibles pueden proporcionar electrodos con un diámetro menor que un micrómetro, y éstos son suficientes para un chip construido de acuerdo con la invención. La cantidad de líquido de muestra necesaria para la medición no es más que la necesaria para extenderse de un electrodo a otro, proporcionando de este modo una vía conductora operativa. La escala fotolitográfica del chip 100 permite realizar la medición en muestras de tamaño de alícuota a un nivel de micro- o nanoescala. Por ejemplo, se puede obtener una medición fiable de la osmolaridad con un volumen de muestra inferior a 20 μ l de película lagrimal. Un volumen de muestra típico es inferior a cien nanolitros (100 nl). Se supone que será relativamente fácil recoger 10 nl de muestra de película lagrimal, incluso de pacientes que sufren de ojo seco.

[0039] El chip 100 está configurado para transferir energía al líquido de muestra 102 y permitir la detección de las propiedades energéticas del líquido de muestra. A este respecto, se aplica una fuente de corriente a los electrodos 108, 109 a través de las conexiones 110. La osmolaridad del líquido de muestra se puede medir detectando las propiedades de transferencia de energía del líquido de muestra 102. Las propiedades de transferencia de energía pueden incluir, por ejemplo, la conductividad eléctrica, para la cual se mide la impedancia del líquido de muestra a una cantidad concreta dada de energía eléctrica (por ejemplo, corriente) que se transfiere a la muestra a través de las conexiones 110 y los electrodos 108, 109.

[0040] Si se ha de medir la conductividad del líquido de muestra, se aplica preferentemente una señal sinusoidal del orden de diez voltios a aproximadamente 100 kHz. Se miden las partes real e imaginaria de la impedancia compleja del recorrido del circuito desde un electrodo 108 hasta el otro electrodo 109 a través del líquido de muestra 102. A las frecuencias de interés es probable que la mayor parte de la señal eléctrica se encuentre en la mitad real del plano complejo, que se reduce a la conductividad del líquido de muestra. Esta señal eléctrica (denominada en lo sucesivo conductividad) se puede relacionar directamente con la concentración de iones en el líquido de muestra 102, y se puede determinar la osmolaridad. Además, si cambia la concentración de iones en el líquido de muestra 102, la conductividad eléctrica y la osmolaridad del líquido cambiarán de forma correspondiente. La osmolaridad se obtiene así de forma segura. Además, puesto que el valor de la impedancia no depende del volumen del líquido de muestra 102, la medición de la osmolaridad se puede realizar de forma sustancialmente independiente del volumen de la muestra.

[0041] Como alternativa a la señal de entrada antes descrita, se pueden aplicar señales más complejas al líquido de muestra, cuya respuesta contribuirá a una estimación más rigurosa de la osmolaridad. Por ejemplo, se puede lograr una calibración midiendo las impedancias a lo largo de un intervalo de frecuencias. Estas impedancias se pueden medir simultánea (por entrada en forma de onda combinada y descomposición de Fourier) o sucesivamente. Los datos de frecuencia frente a los de impedancia proporcionan información acerca de la muestra y del rendimiento relativo del circuito de medición del líquido de muestra.

[0042] La figura 2 ilustra una realización alternativa de un chip receptor de muestras 200 que mide la osmolaridad de un líquido de muestra 202, en la que el chip comprende una capa de sustrato 204 con una región de muestras 206 que comprende un circuito impreso que incluye un conjunto de electrodos 208. En la realización ilustrada en la figura 2, la región de muestras 206 presenta un conjunto de 5 por 5 electrodos que están impresos con técnicas fotolitográficas, presentando cada electrodo 208 una conexión 210 a un lado del sustrato 204. Para simplificar la ilustración, no todos los electrodos 208 se muestran en la figura 2 con una conexión. Los electrodos proporcionan mediciones a una unidad de procesamiento separada, descrita con más detalle más adelante.

[0043] El conjunto de electrodos de la figura 2 proporciona un medio para medir el tamaño de la gota de lágrima 202 detectando la cantidad de electrodos conductores 208 para determinar de este modo el tamaño de la gota. En

particular, la circuitería de procesamiento puede determinar el número de electrodos que están conduciendo, y por lo tanto se determina el número de electrodos adyacentes que están cubiertos por la gota 202. De este modo se determina el área plana del sustrato que está cubierta por el líquido de muestra. Con una tensión superficial nominal conocida del líquido de muestra se puede estimar de forma fiable la altura del volumen de líquido de muestra sobre el área plana y, por lo tanto, se puede determinar el volumen de la gota 202.

[0044] La figura 3 ilustra otra realización alternativa de un chip receptor de muestras 300 en el que se deposita un líquido de muestra 302. El chip comprende una capa de sustrato 304 en la que una región de muestras 306 está provista de electrodos 308 que están configurados en una pluralidad de círculos concéntricos. Cada electrodo 308 se puede conectar a un lado de la capa de sustrato 304 mediante las conexiones 310. De forma similar al conjunto cuadrado de la figura 2, la disposición circular de los electrodos 308 de la figura 3 también proporciona una estimación del tamaño del volumen del líquido de muestra 302, puesto que la gota típicamente cubre un área circular u ovalada de la región de muestras 302. La circuitería de procesamiento puede detectar el círculo más grande (más exterior) de electrodos que son conductores y determinar de este modo un área plana cubierta por la muestra de líquido. Igual que antes, el área plana determinada, en combinación con una tensión superficial conocida y la altura correspondiente del volumen del líquido de muestra 302, proporciona una estimación del volumen. En la realización ilustrada en la figura 3, los electrodos 308 se pueden imprimir usando técnicas fotolitográficas conocidas que permitan actualmente que los electrodos presenten un diámetro comprendido en el intervalo de uno (1) a ochenta (80) micrómetros. Esto permite que una gota del orden de submicrolitros cubra sustancialmente los electrodos. Los electrodos pueden estar impresos sobre un área dimensionada para recibir el líquido de muestra, que generalmente cubre entre 1 mm^2 y 1 cm^2 .

[0045] Los electrodos y las conexiones mostrados en la figura 1, la figura 2 y la figura 3 se pueden imprimir sobre las capas de sustrato respectivas en forma de electrodos con placas de contacto usando técnicas fotolitográficas. Por ejemplo, los electrodos se pueden formar con diferentes metalizaciones conductoras, como aluminio, platino, titanio, titanio-tungsteno y otro material similar. En una realización, los electrodos se pueden formar con un borde dieléctrico para proteger las densidades de campo en los cantos de los electrodos. Esto puede reducir un campo eléctrico, de otro modo inestable, en el borde del electrodo.

[0046] En la figura 4 y la figura 5 se ilustran, respectivamente, vistas superiores de los ejemplos de realización de los chips 200 y 300. Las realizaciones muestran el diseño detallado de los electrodos y las conexiones e ilustran cómo cada electrodo se puede conectar eléctricamente para medir las propiedades eléctricas de una gota de muestra. Como se ha mencionado anteriormente, el diseño de los electrodos y las conexiones se puede imprimir en el sustrato 100, 200, 300 usando técnicas fotolitográficas conocidas.

[0047] La figura 6 es un diagrama esquemático de un sistema osmométrico 600 configurado de acuerdo con una realización de la presente invención, que muestra cómo la información se determina y usa en un procedimiento que determina la osmolaridad de un líquido de muestra. El sistema osmométrico 600 incluye un dispositivo de medición 604 y un dispositivo de procesamiento 606. El dispositivo de medición recibe un volumen de líquido de muestra desde un dispositivo colector 608. El dispositivo colector puede comprender, por ejemplo, una micropipeta o un tubo capilar. El dispositivo colector 608 recoge una muestra de película lagrimal de un paciente, usando, por ejemplo, la presión negativa de una micropipeta de volumen fijo o la atracción de cargas de un tubo capilar para extraer un pequeño volumen de lágrimas de la proximidad de la superficie ocular de un paciente.

[0048] El dispositivo de medición 604 puede comprender un sistema que transfiera energía al líquido en la región de muestras y detecte la energía transmitida. Por ejemplo, el dispositivo de medición 604 puede comprender una circuitería que proporciona energía eléctrica en una forma de onda especificada (procedente, por ejemplo, de un generador de funciones) al recorrido eléctrico compuesto por dos electrodos puenteados por el líquido de muestra. El dispositivo de procesamiento 606 detecta la energía transmitida al líquido de muestra y determina la osmolaridad. El dispositivo de procesamiento puede comprender, por ejemplo, un sistema que incluye un multímetro RLC que genera datos relacionados con la reactancia del líquido que forma la vía conductora entre dos electrodos y que incluye un procesador que determina la osmolaridad mediante un esquema de consulta de tablas. Si se desea, el dispositivo de procesamiento se puede alojar en una unidad de base que recibe uno de los chips antes descritos.

[0049] Como se ha mencionado anteriormente, una muestra suficiente para realizar una medición de la osmolaridad puede contener menos de 20 microlitros (μl) de líquido. Se recoge una muestra típica de película lagrimal de acuerdo con la invención mediante un colector de líquidos, tal como un tubo capilar, que con frecuencia contiene menos de un microlitro de película lagrimal. Los profesionales médicos estarán familiarizados con el uso de micropipetas y tubos capilares y serán capaces de recoger fácilmente los pequeños volúmenes de muestra descritos

en la presente memoria, incluso en el caso de pacientes que sufren de ojo seco.

[0050] El líquido de muestra recogido se vierte del dispositivo colector 608 al dispositivo de medición 604. El dispositivo colector puede ser colocado encima de la región de muestras del sustrato del chip bien manualmente por un profesional médico o bien mediante guiado mecánico sobre la región de muestras. En una realización, por ejemplo, el dispositivo colector (por ejemplo, un tubo capilar) es guiado mecánicamente a su posición mediante un orificio plástico moldeado por inyección en una unidad de base, o se ajusta a un conjunto de dispositivos de fijación mediante tornillos de precisión (por ejemplo, un micromanipulador con agujas para interfaces microchip). En otra realización, la guía es una circuitería de control retroalimentada, guiada por ordenador, que sujeta el tubo capilar y lo baja automáticamente a la posición apropiada.

[0051] Los electrodos y las conexiones de los chips miden las propiedades energéticas del líquido de muestra, como la conductividad, y permiten que el dispositivo de procesamiento 606 reciba las propiedades medidas. Las propiedades energéticas medidas del líquido de muestra incluyen la conductividad eléctrica y también pueden incluir otros parámetros, como ambas partes de la impedancia compleja de la muestra, la variación del ruido en la señal de salida y la desviación de las mediciones debida al calentamiento resistivo del líquido de muestra. Las propiedades energéticas medidas se procesan en el dispositivo de procesamiento 606 para proporcionar la osmolaridad de la muestra. En una realización, el dispositivo de procesamiento 606 comprende una unidad de base que puede aceptar un chip y establecer una conexión eléctrica entre el chip y el dispositivo de procesamiento 606. En otra realización, la unidad de base puede incluir una unidad de visualización para visualizar los valores de osmolaridad. Cabe señalar que el dispositivo de procesamiento 606, y en particular la unidad de base, puede ser una unidad portátil.

[0052] La figura 7 es una vista en perspectiva de un sistema de medición 700 de la osmolaridad de películas lagrimales construido de acuerdo con la presente invención. En la realización ilustrada en la figura 7 el sistema ejemplar 700 incluye una unidad de medición 701 que comprende un chip, como uno de los chips descritos anteriormente, y una base conectora o de enchufe 710 que proporciona la salida apropiada para la medición. El sistema 700 determina la osmolaridad midiendo la conductividad eléctrica del líquido de muestra: por lo tanto, el chip de medición 701 comprende un chip de circuitos integrados (CI) semiconductores con un sustrato que presenta una construcción similar a la de los chips descritos anteriormente en relación con la figura 1 a la figura 5. Así, el chip 701 incluye una capa de sustrato con una región de muestras definida por al menos dos electrodos impresos sobre la capa de sustrato (la escala de estos detalles es demasiado pequeña para ser visible en la figura 7; véanse la figura 1 a la figura 5). El sustrato y la región de muestras están envueltos en una cápsula inerte de manera conocida para los expertos en la técnica. En particular, el chip 701 se fabrica usando técnicas de fabricación de semiconductores convencionales en una cápsula de CI 707 que incluye patas de conexión eléctrica 708 que permiten al chip 701 recibir señales eléctricas y comunicar la salida al exterior del chip. La cápsula 707 proporciona una carcasa que hace más práctico el manejo del chip y ayuda a reducir la evaporación del líquido de muestra.

[0053] La figura 8 muestra que el chip de medición 701 está fabricado con un orificio exterior 720 por el que se inserta el líquido de muestra 702. Así, el orificio 720 se puede formar en la cápsula 707 del semiconductor para proporcionar una vía desde el exterior del chip hasta el sustrato 804 y la región de muestras 806. El dispositivo colector (tal como una micropipeta o un tubo capilar) 808 se coloca en el orificio 720 de tal manera que el líquido de muestra 702 sea vertido directamente del dispositivo colector a la región de muestras 806 del sustrato 804. El orificio 720 está dimensionado para recibir la punta del dispositivo colector. El orificio 720 forma una abertura o embudo que conduce desde el exterior del chip hasta la región de muestras 806 del sustrato 804. De este modo, el líquido de muestra 702 es expulsado por el dispositivo colector 808 y se deposita directamente sobre la región de muestras 806 del sustrato 804. La región de muestras está dimensionada para recibir del dispositivo colector un volumen del líquido de muestra. En la figura 8, los electrodos forman una región de muestras 806 que generalmente presenta un área comprendida en el intervalo de aproximadamente 1 mm^2 a 1 cm^2 .

[0054] Volviendo a la figura 7, el chip 701 puede incluir una circuitería de procesamiento 704 que comprende, por ejemplo, un generador de funciones que genera una señal con una forma de onda deseada, la cual se aplica a los electrodos de la región de muestras del chip, y un dispositivo de medición del voltaje para medir el valor cuadrático medio (RMS) del voltaje que se lee a partir de los electrodos del chip. El generador de funciones puede producir una corriente alterna (CA) de alta frecuencia para evitar los efectos no deseados de la corriente continua (CC) en el proceso de medición. El dispositivo de medición del voltaje puede incorporar la funcionalidad de un dispositivo de medición RLC. De este modo, el chip 701 puede incorporar la circuitería de medición, así como los electrodos de la región de muestras. La circuitería de procesamiento puede incluir una unidad de procesamiento central (CPU) y una memoria asociada que puede almacenar instrucciones de programación (tales como microprogramas) y datos. De esta manera, un solo chip puede incluir los electrodos y las conexiones asociadas para la región de muestras, y en

una región separada del chip también puede incluir la circuitería de medición. Esta configuración minimiza las resistencias de dispersión asociadas de las estructuras del circuito.

5 **[0055]** Como se ha señalado anteriormente, la circuitería de procesamiento 70 aplica una forma de onda de una señal a los electrodos de la región de muestras. La circuitería de procesamiento también recibe de los electrodos las señales de las propiedades energéticas y determina el valor de osmolaridad del líquido de muestra. Por ejemplo, la unidad de procesamiento recibe valores de conductividad eléctrica de un conjunto de parejas de electrodos. Los expertos en la técnica están familiarizados con las técnicas y la circuitería para determinar la conductividad de un líquido de muestra que forma una vía conductora entre dos o más electrodos.

10 **[0056]** En la realización de la figura 7, la unidad de procesamiento 704 produce formas de onda de la señal a una sola frecuencia, como 100 kHz y 10 voltios de pico a pico. La circuitería de procesamiento 704 determina después el valor de osmolaridad a partir del contenido de sodio correlacionado con la conductividad eléctrica usando una curva de calibración, como la curva mostrada en la figura 9. En este caso, la curva de calibración se ha elaborado como
15 una función de transferencia entre la conductividad eléctrica (voltaje) y el valor de osmolaridad (es decir, el contenido de sodio). Cabe señalar, sin embargo, que también se pueden elaborar otras curvas de calibración para proporcionar funciones de transferencia entre otras propiedades energéticas y el valor de osmolaridad. Por ejemplo, se pueden incluir en el cálculo de la osmolaridad la variación, la autocorrelación y la desviación de la señal. Si se desea, el valor de osmolaridad también se puede obtener mediante diagramas del coeficiente de correlación
20 multivariable o la interpretación de redes neuronales de manera que el valor de osmolaridad se pueda optimizar con un conjunto arbitrariamente grande de variables medidas.

[0057] En una forma alternativa de la realización de la figura 7, la unidad de procesamiento 704 produce formas de onda de la señal con un barrido de frecuencias predeterminado, como de 1 kHz a 100 kHz en incrementos de 1 kHz,
25 y almacena los valores de conductividad y de variación recibidos del conjunto de parejas de electrodos a cada frecuencia. La curva de la señal de salida frente a la frecuencia se puede usar después para proporcionar información de orden superior acerca de la muestra, que se puede usar con las funciones de transferencia antes mencionadas para producir una lectura ideal de la osmolaridad.

30 **[0058]** Como se muestra en la figura 7, el conector de base de enchufe 710 aloja las clavijas 708 del chip 701 en los enchufes 711 correspondientes. El conector 710, por ejemplo, puede suministrar la energía eléctrica necesaria a la circuitería de procesamiento 704 y a los electrodos del chip. Así, el chip puede incluir los electrodos de la región de muestras, el generador de señales y la circuitería de procesamiento necesarios para determinar la osmolaridad, y la salida que comprende el valor de osmolaridad se puede comunicar hacia fuera del chip a través del conector 710
35 y mediante las clavijas 708 a un lector de visualización.

[0059] Si se desea, el conector de base de enchufe 710 puede incluir una capa de Peltier 712 situada debajo de los enchufes que reciben las clavijas 708 del chip 701. Los expertos en la técnica entenderán que una capa de Peltier comprende una unión eléctrica/cerámica para que la corriente, aplicada apropiadamente, pueda enfriar o
40 calentar la capa de Peltier. De este modo, el chip de muestras 701 se puede calentar o enfriar, controlando de esta manera adicionalmente la evaporación del líquido de muestra. Resulta evidente que la evaporación del líquido de muestra debe controlarse cuidadosamente para asegurar la obtención de valores de osmolaridad precisos a partir del líquido de muestra.

45 **[0060]** La figura 10 muestra una realización alternativa de un osmómetro en la que el chip no incluye una unidad de procesamiento en el chip, como se ha descrito anteriormente, sino que en lugar de ello incluye una circuitería limitada que comprende principalmente los electrodos de la región de muestras y las interconexiones. Es decir, la unidad de procesamiento está dispuesta separada del chip y se puede proporcionar en la unidad de base.

50 **[0061]** La figura 10 muestra en detalle un osmómetro 1000 que incluye una unidad de base 1004, que aloja el conector de base 710, y una cubierta articulada 1006 que se cierra sobre el conector de base 710 y un chip de medición 701 recibido. Así, una vez distribuido el líquido de muestra en el chip, el chip se inserta en el conector de enchufe 710 de la unidad de base 1004 y la cubierta articulada 1006 se cierra sobre el chip para reducir la tasa de evaporación del líquido de muestra.

55 **[0062]** Cabe señalar que el problema de la evaporación relativamente rápida del líquido de muestra generalmente se puede manejar de una de las dos maneras siguientes. Una manera consiste en medir rápidamente el voltaje del líquido de muestra lo antes posible después de colocar la gota en la región de muestras del chip. Otra manera consiste en permitir a la unidad de medición medir la tasa de evaporación junto con los cambios correspondientes en

los valores de conductividad. La unidad de procesamiento puede procesar posteriormente la salida para estimar el valor de osmolaridad. El procesamiento se puede realizar en el hardware o en el software almacenado en el hardware. Así, la unidad de procesamiento puede incorporar diferentes técnicas de procesamiento, tales como el uso de redes neuronales para recoger y conocer las características de las muestras de líquido cuya osmolaridad se
5 esté midiendo, así como variaciones de temperatura, cambios de volumen y otros parámetros relacionados, de manera que el sistema se pueda preparar de acuerdo con las técnicas de redes neuronales para realizar mediciones de osmolaridad más rápidas y precisas.

[0063] La figura 11 muestra otra construcción alternativa en la que el sistema de osmolaridad usa un chip receptor
10 de muestra 1102 que no incluye la cápsula de CI como se muestra en la figura 7. En su lugar, el chip de medición 1102 de la figura 11 está configurado en forma de un chip con una región de muestras expuesta que comprende los electrodos y las conexiones asociadas, pero la circuitería de procesamiento está situada en la unidad de base para medir las propiedades energéticas del líquido de muestra. En esta construcción alternativa, un conector similar al conector de enchufe 710 permite transmitir las propiedades energéticas medidas a la unidad de procesamiento
15 dispuesta en la unidad de base. Los expertos en la técnica entenderán que una configuración de este tipo se denomina comúnmente estructura de tarjeta sonda.

[0064] La figura 11 muestra una unidad de base de tarjeta sonda 1100 que recibe una tarjeta sonda con chip de muestra 1102 que comprende un sustrato 1104 con una región de muestras 1106 en la que se encuentran
20 electrodos 1108 que están unidos, a través de alambres, a los conectores de borde 1110 de la tarjeta sonda. Cuando la tapa articulada 1112 de la unidad de base se cierra sobre la tarjeta sonda, las púas de conexión 1114 dispuestas en la cara inferior de la tapa entran en contacto de acoplamiento con los conectores de borde 1110. De este modo, los electrodos de la región de muestras 1106 se acoplan a la circuitería de procesamiento, y se puede efectuar la medición. La circuitería de procesamiento de la realización de tarjeta sonda de la figura 11 se puede
25 configurar según una de las configuraciones antes descritas. Es decir, la circuitería de procesamiento para la aplicación de corriente a los electrodos y para la detección de las propiedades energéticas del líquido de muestra y la determinación de la osmolaridad pueden encontrarse en el chip o en el sustrato de la tarjeta sonda 1103, o bien la circuitería de procesamiento puede encontrarse fuera del chip en la unidad de base 1100.

[0065] En todas las realizaciones alternativas antes descritas, el osmómetro se usa colocando un nuevo chip de medición en la unidad de base mientras la parte superior articulada está abierta. Una vez colocado en la unidad de base, el chip desciende y comienza a monitorizar su entorno. El registro de las señales de salida del chip a una frecuencia de, por ejemplo, 1 kHz captará totalmente el comportamiento del sistema. La colocación de una muestra sobre cualquier porción del conjunto de electrodos genera un gran aumento de la relación señal/ruido en la
35 conductividad entre la pareja aliada de electrodos cubierta por el líquido de muestra. La unidad de procesamiento reconocerá el cambio en la conductividad como relacionado directamente con la adición del líquido de muestra y comenzará a convertir las señales electrónicas en datos de osmolaridad una vez que se haya identificado este tipo de cambio. Esta estrategia se realiza sin la intervención de profesionales médicos. Es decir, el procesamiento del chip se inicia después del acoplamiento a la unidad de base y no depende de la manipulación de la tapa de la
40 unidad de base ni de ninguna otra intervención del usuario.

[0066] En cualquiera de las configuraciones antes descritas, bien el "chip inteligente" con la circuitería de procesamiento en el chip (figura 7) o bien la configuración de solo electrodos con la circuitería de procesamiento fuera del chip (figura 10), en un chip encapsulado (figura 7 y figura 10) o en una tarjeta sonda (figura 11), el chip receptor de muestras se puede desechar después de cada uso, de manera que la unidad de base sirve como
45 plataforma para la interconexión con el chip de medición desechable. Como se ha señalado, la unidad de base también puede incluir circuitos relevantes de control, comunicación y visualización (no mostrados), así como software, o tales características se pueden proporcionar fuera del chip en la unidad de base. A este respecto, la circuitería de procesamiento se puede configurar para que suministre automáticamente suficiente energía a los
50 electrodos de la región de muestras para oxidarlos irreversiblemente después de un ciclo de medición, de manera que los electrodos queden inutilizables para cualquier ciclo de medición posterior. Al insertar un chip usado en la unidad de base, el usuario recibirá la indicación de que los electrodos son inutilizables. Esto ayuda a prevenir el uso múltiple inadvertido de un chip de muestra, lo que puede dar lugar a lecturas de osmolaridad poco precisas y a condiciones potencialmente antihigiénicas.

[0067] Una segunda estrategia para asegurar que un chip usado previamente no se vuelva a colocar en la máquina incluye la codificación de números de serie o códigos directamente en el chip. La unidad de base almacenará los números de los chips en la memoria y los contrastará con los nuevos chips colocados en el conector de base. Si la unidad de base descubre que el número de serie del chip usado es el mismo que el de un chip
55

antiguo, el sistema rechazará medir la osmolaridad hasta que se haya insertado un nuevo chip. Es importante asegurar el uso de un nuevo chip para cada prueba ya que, una vez que la evaporación ha tomado su curso, se absorben proteínas y se forman cristales en los electrodos, lo que corrompe la integridad de los electrodos de medición.

5

[0068] La figura 12 es un diagrama de flujo que describe un ejemplo de la técnica de medición de la osmolaridad de acuerdo con la invención. En la zona 1300 se recoge una muestra de líquido corporal, tal como una película lagrimal. La muestra típicamente contiene menos de un microlitro. En la zona 1302, la muestra recogida se deposita en una región de muestras del sustrato del chip. Las propiedades energéticas de la muestra se miden después en la zona 1304. Las propiedades energéticas medidas se procesan a continuación en la zona 1306 para determinar la osmolaridad de la muestra. Si el chip funciona de acuerdo con la medición de la conductividad eléctrica, el procesamiento de la medición en la zona 1306 puede incluir la operación de "oxidación de los electrodos" descrita anteriormente, que hace que los electrodos del chip queden inutilizables para cualquier ciclo de medición posterior.

10

[0069] En el proceso de medición de un sistema de medición de la conductividad se observa un desplazamiento sustancialmente instantáneo del voltaje de circuito abierto a un valor que representa esencialmente el estado de la muestra en el momento de su recogida, después de colocar una película lagrimal de muestra en un conjunto de electrodos del sustrato. Seguidamente, una desviación en la conductividad de la muestra se reflejará en un cambio continuo en la salida.

20

[0070] La salida del chip de medición puede ser un voltaje variable en el tiempo que se traduce en un valor de osmolaridad. Así, en un sistema basado en la conductividad, se puede obtener más información que meramente la "conductividad eléctrica" de la muestra midiendo la respuesta a la frecuencia a lo largo de un amplio intervalo de señales de entrada, lo que mejora el procesamiento final. Por ejemplo, la calibración se puede realizar a lo largo de múltiples frecuencias (por ejemplo, relación de mediciones de las señales a 10, 20, 30, 40, 50, 100 Hz) para convertir el proceso de medición en un cálculo relativo. Esto reduce la desviación del voltaje de un chip a otro. El procedimiento convencional para mediciones a gran escala basadas en electrodos (es decir, en un pHmetro o una técnica de microcapilares) consiste en recurrir a tampones conocidos para establecer una curva de calibración lineal. Puesto que la fotolitografía es una técnica de producción relativamente reproducible, cuando se acopla a un barrido de frecuencias se puede realizar la calibración sin la intervención del operador.

30

[0071] Como se ha mencionado anteriormente, el procesamiento de las propiedades energéticas se puede efectuar en una configuración de red neuronal, en la que los puntos de entrada de datos medidos, aparentemente dispares, obtenidos a partir de las propiedades energéticas se pueden usar para proporcionar una lectura de la osmolaridad más precisa que a partir de la medición de una sola propiedad energética. Por ejemplo, si solo se mide la conductividad eléctrica de la muestra, la curva de calibración se puede usar para obtener simplemente el valor de osmolaridad correspondiente a la conductividad. Este valor de osmolaridad, sin embargo, generalmente no será tan preciso como la salida de la red neuronal.

35

[0072] La red neuronal se puede diseñar para trabajar con una colección de curvas de calibración que refleje una función de transferencia sustancialmente optimizada entre las propiedades energéticas del líquido de muestra y la osmolaridad. Así, en una realización, la red neuronal elabora una colección de curvas de calibración para todas las variables de interés, tales como voltaje, tasa de evaporación y cambio de volumen. La red neuronal también puede elaborar o recibir como entrada una lista de prioridades que asigna un factor de importancia a cada variable para indicar la importancia de la variable para el resultado final o el valor de osmolaridad. La red neuronal elabora las curvas de calibración a partir de ejemplos de datos reales en los que el resultado final es conocido *a priori*. Por consiguiente, la red neuronal estará preparada para predecir el resultado final a partir de la mejor combinación posible de variables. Esta configuración de red neuronal que procesa las variables en una combinación eficaz se carga después en la unidad de procesamiento que reside en el chip de medición 701 o en la unidad de base. Una vez preparada, la red neuronal se puede configurar en software o hardware.

50

[0073] La capacidad para identificar y sustraer defectos de fabricación en los electrodos antes de realizar los ensayos de osmolaridad también puede ser importante. Esto también se puede lograr por calibración de un dispositivo de calibración de la osmolaridad que comprende un chip de osmolaridad, como el chip 1200 ilustrado en la figura 2. Este tipo de calibración también se puede lograr, posiblemente de una manera más eficaz, mediante el uso de redes neuronales, pero se entiende que tales redes no son necesarias para lograr los procesos de calibración descritos en la descripción siguiente.

55

[0074] Clásicamente, los electrodos de metal no recubiertos se consideraban dispositivos de medición malos

cuando se ponían en contacto directo con una solución electroquímica de interés. En primer lugar, puede existir una doble capa de contraiones que rodea el electrodo en la interfase de metal/solución y que puede crear un campo de magnitud suficiente como para alterar significativamente la cantidad de iones de interés. En soluciones a granel, las corrientes de convección o la agitación pueden destruir estas distribuciones y causar ruido variable en el tiempo, 5 cuya magnitud es del orden de la señal relevante. Además, la polarizabilidad y la histéresis de los electrodos pueden causar problemas si se aplican señales pequeñas a los electrodos. Finalmente, el suministro de una CC grande o de una CA de baja frecuencia desde el electrodo también puede provocar una electrolisis irreversible cuyo resultado es la formación de burbujas y la oxidación de especies biológicas importantes. Las burbujas introducen desplazamientos dieléctricos variables en proximidad del electrodo e invalidan las inferencias extraídas de la 10 solución a partir de los voltajes medidos en tales condiciones.

[0075] Una solución convencional para estos efectos consiste en separar físicamente los electrodos de la solución mediante un puente salino, con lo cual la formación de burbujas y otras no linealidades en el entorno inmediato de los electrodos activos son prácticamente irrelevantes para la distribución de iones en estado estacionario que fluyen 15 lejos de los electrodos. A modo de ejemplo, en los dispositivos configurados para medir el pH de una solución, los electrodos metálicos se pueden separar de la solución a granel mediante una membrana semipermeable, tal como vidrio o material cerámico. Además, el electrodo metálico dentro de la membrana semipermeable se compone generalmente de Ag (plata) o calomel (mercurio) inmerso en una solución de cloruro de plata o cloruro mercurioso. Esto permite que una única reacción química domine la acción en proximidad del electrodo. La reacción se puede 20 mantener cercana al equilibrio, y cuando se crea un gradiente de iones a través de la membrana semipermeable, se transmite una fuerza osmótica a la superficie del electrodo a través de la reacción redox simétrica que impulsa el sistema de vuelta al equilibrio. De este modo, los iones están equilibrados en la interfase vidrio/ solución y electrodo/ tampón y se pueden minimizar las no linealidades.

[0076] Sin embargo, a diferencia de los sistemas de medición típicos, las mediciones clínicas de la osmolaridad de la película lagrimal humana requieren electrodos mucho más pequeños que los sistemas tradicionales. Esto se debe al hecho de que unas decenas de nanolitros representan el volumen máximo viable recogido de pacientes con, por ejemplo, queratoconjuntivitis seca. Como se ha descrito anteriormente, los sistemas y procedimientos descritos en la presente memoria pueden tener en cuenta un dispositivo clínico para mediciones de lágrimas que cumpla los 30 estrictos requisitos para mediciones y diagnósticos precisos en este área, usando electrodos metálicos no recubiertos impresos sobre un microchip, por ejemplo como se muestra en la figura 1 y la figura 2. Como resultado, ninguna de las soluciones tradicionales para el blindaje de los electrodos es factible para tales dispositivos, ya que las dimensiones físicas son demasiado pequeñas. Con, por ejemplo, un diámetro de 80 μm , los electrodos fotolitografiados excluyen la posibilidad de que se fabriquen membranas de forma económica. Por ejemplo, una capa 35 de gel permeable recubierta por centrifugación es prohibitivamente cara, da como resultado un proceso de bajo rendimiento e introduce varias variaciones en la fabricación. Además, las perturbaciones osmóticas debidas a los gradientes del puente salino arrollarían el minúsculo volumen de la muestra de interés. Por lo tanto, muchos de los procedimientos típicos para realizar mediciones con electrodos de gran escala no se pueden aplicar a microelectrodos, y quedan pendientes cuestiones de calibración adicionales. 40

[0077] Con el fin de establecer un perfil de calibración lineal en el que la entrada se encuentre a la misma escala que la salida, los electrodos de gran escala convencionales se sumergen típicamente en múltiples patrones conocidos. Por ejemplo, los pHmetros usan un conjunto de tres tampones a pH 4, 7 y 10, marcando cada líquido un punto para la recta ajustada. Entre cada punto de calibración, el electrodo de gran escala se puede lavar y secar 45 para asegurar que los patrones no se mezclan. Si se asume que el tampón del electrodo en el interior de la cámara de vidrio presenta cierta concentración, la calibración se puede realizar con tan solo un punto patrón. Sin embargo, a lo largo del tiempo, el tampón del electrodo, inicialmente homogéneo, se va contaminando con las sustancias que ha medido, lo que requiere entonces una calibración con al menos dos puntos para ser preciso.

[0078] Sin embargo, cuando se trabaja con microelectrodos, los pasos de calibración convencionales, como los descritos anteriormente, son a menudo imposibles de realizar sin arriesgarse a dañar el conjunto y comprometer cualquier medición subsiguiente. Por ejemplo, después de colocar un patrón de calibración en el chip, resulta poco práctico limpiar el conjunto con papel, puesto que los arañazos en la superficie del electrodo darán lugar a densidades de corriente excesivamente elevadas en el borde del arañazo, lo que conduce entonces a la formación 50 de burbujas y mediciones no válidas. Además, si se usara un modelo de lágrimas humanas para el patrón de calibración, es decir, con 10 mg/ml de BSA como constituyente, la adsorción de proteína a la superficie del electrodo corrompería la pureza de una medición clínica. Finalmente, si se usara una pequeña cantidad de solución salina para fijar los puntos de calibración, el líquido se evaporaría, dejando cantidades muy notables de cristales de sal en zonas aleatorias de la superficie del chip. Esta sal residual se disolverá después en cualquier muestra posterior que 55

se coloque en el chip y, al contrario que la independencia del volumen mostrada por la conductividad, ligeras diferencias en la cantidad de líquido depositado como patrón darán como resultado diferentes cantidades de sal añadida a la muestra de líquido de interés.

5 **[0079]** Por último, una prueba clínica para el ojo seco requiere una conversión del movimiento relativo de los iones en solución en una osmolaridad absoluta que se pueda comparar de una prueba a otra a lo largo del tiempo. El valor final debe ser independiente del dispositivo de medición y estable a lo largo del tiempo para cumplir los propósitos de diagnóstico. Por consiguiente, la capacidad para calibrar un conjunto de microelectrodos, como los descritos anteriormente, puede verse entorpecida por varios retos pendientes en el intento de obtener las tolerancias más
10 estrictas posibles para el dispositivo de medición.

[0080] Sin embargo, como se describirá más adelante, se pueden usar varias estrategias para calibrar un conjunto de microelectrodos, como los descritos anteriormente, de acuerdo con los sistemas y procedimientos descritos en la presente memoria. Estas estrategias pueden partir cada una de la determinación de una conductividad intrínseca
15 para cada electrodo en el conjunto. Esta conductividad intrínseca se puede almacenar y usar para sustraer el efecto de la conductividad intrínseca de las mediciones finales de las propiedades eléctricas de un líquido de ensayo, tal como una lágrima. Dependiendo de la realización, se puede o no usar un patrón para la determinación de un factor de calibración para los electrodos. Asimismo, cuando se usa un patrón, se puede o no incluir un paso de lavado siguiente.
20

[0081] Cabe destacar también que las diferentes estrategias se pueden combinar de una manera modular para producir resultados de calibración aún más precisos. Las estrategias se pueden usar apiladas para producir niveles sucesivos de complejidad con el fin de minimizar la variabilidad de una prueba a otra.

25 **[0082]** La figura 13 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento para la calibración de un dispositivo de medición de la osmolaridad que no usa ningún patrón de acuerdo con una realización de los sistemas y procedimientos descritos en la presente memoria. En la zona 1402 se mide la conductividad intrínseca de los electrodos. La conductividad intrínseca medida para cada electrodo se puede almacenar después en una memoria. En la zona 1404 se introduce un líquido de muestra de interés, tal como una película lagrimal, en el
30 dispositivo de medición y en la zona 1406 se miden las propiedades eléctricas del líquido de muestra. En una realización, la circuitería de procesamiento también identifica, en la zona 1408, los electrodos del conjunto de electrodos que están en contacto con el líquido de muestra. Los electrodos que están en contacto con el líquido de muestra son electrodos conductores, y la identidad de los electrodos conductores también se puede almacenar en la memoria. En la zona 1410, la circuitería de procesamiento ajusta las propiedades eléctricas medidas del líquido de
35 muestra para tener en cuenta, por parejas, la conductividad intrínseca de los electrodos que realizaron la medición de la muestra. Este ajuste proporciona una medición de la osmolaridad de la muestra sola y es independiente de las variaciones del grosor de la metalización de los electrodos, la deposición dieléctrica y de otras variaciones en los electrodos que puedan ocurrir durante la fabricación del dispositivo de medición.

40 **[0083]** En una realización, la conductividad intrínseca se puede determinar (zona 1402) aplicando una corriente CC al conjunto de electrodos y midiendo el voltaje de salida resultante para cada electrodo. La resistencia correspondiente se puede calcular después en base a la corriente CC y el voltaje de salida y, por ejemplo, almacenar en la memoria. En una realización alternativa, se puede generar una señal más compleja, por ejemplo una onda sinusoidal, en el dominio temporal y aplicarla al conjunto de electrodos. Las salidas correspondientes se
45 pueden medir y almacenar. Después se puede aplicar una transformada de Fourier a los datos de salida almacenados. El resultado es un mapa de amplitud frente a frecuencia que indica la conductancia relativa en un intervalo de frecuencias para cada electrodo. Este mapa se puede generar para un intervalo de frecuencias de interés para una implementación concreta, por ejemplo desde el intervalo de bajos kHz hasta el de MHz.

50 **[0084]** Con el fin de suministrar una señal de corriente a cada electrodo y medir la salida resultante con propósitos de calibración, se pueden proporcionar dos hilos para cada electrodo. Después se puede aplicar la señal de corriente y medir la salida para un electrodo dado a través de los dos hilos.

[0085] En una realización de este tipo, se puede asumir que la pendiente de la curva de calibración resultante es
55 constante a lo largo del tiempo. La curva se puede incorporar después en un dispositivo de medición de la osmolaridad, como los descritos anteriormente. Los ajustes de las determinaciones de la osmolaridad se pueden efectuar por sustracción de la resistencia del electrodo, lo que simplemente desplazará el mapeo de entrada a lo largo del eje X de la curva de calibración. Dependiendo de la realización, se pueden tener en cuenta otros efectos, tales como los efectos de la humedad y la temperatura ambiental, en el procesamiento posterior de la señal.

- [0086]** La capacidad para establecer la conductividad intrínseca de cada pareja de electrodos antes de la prueba también proporciona un límite de confianza a las posiciones del conjunto. De este modo, el electrodo se define como un proceso aleatorio de variables gaussianas aleatorias con una media y varianza de la muestra definidas por los cálculos de conductividad anteriores. Cualquier electrodo que se encuentre fuera del percentil 95 de la varianza esperada se puede considerar defectuoso, y sus señales se pueden despreciar en futuros cálculos. Esta capacidad para abordar selectivamente las parejas de electrodos en un conjunto aumenta la capacidad para calibrar la lectura y protegerlas contra falsos defectos de fabricación.
- 10 **[0087]** A modo de ejemplo, hay que recordar que el conjunto de electrodos de la figura 2 proporciona un medio para medir el tamaño de, por ejemplo, una gota de lágrima 202 mediante la detección de la extensión de los electrodos conductores 208 para determinar de este modo la extensión de la gota. En particular, la circuitería de procesamiento puede determinar el número de electrodos que son conductores y, por lo tanto, el número de electrodos adyacentes que están cubiertos por la gota 202. Las identidades de los electrodos del conjunto que son conductores y están en contacto con el líquido de muestra 202 se pueden almacenar en la memoria.
- 15 **[0088]** Así, una vez completado el ensayo de la muestra, se puede sustraer la conductividad intrínseca de todas las parejas de electrodos conductores de la señal de salida de la muestra para calcular un valor de osmolaridad indicativo de la muestra sola. En una realización, es importante reconocer que el líquido de muestra 202 no cubrirá todos los electrodos del conjunto. Por lo tanto, solo se incluyen en el cálculo aquellos electrodos que son conductores y están en contacto con el líquido de muestra 202 para ajustar la medición de la muestra. Como se ha mencionado, la medición de la osmolaridad resultante del líquido de muestra 202 se realiza, por tanto, independientemente de las variaciones del grosor de la metalización de los electrodos, la deposición dieléctrica y de otras variaciones que puedan ocurrir durante la fabricación en los electrodos conductores que realizan la medición.
- 20 **[0089]** Aunque los sistemas y procedimientos de calibración ya descritos son útiles y sencillos de implementar, requiriendo un mínimo procesamiento posterior de software para realizar cualquier corrección necesaria, es poco probable que este procedimiento detecte deformaciones marcadas en las geometrías de los electrodos, tales como picos metálicos o bordes rugosos, puesto que estos defectos no alterarán significativamente la conductividad intrínseca de los electrodos. Se puede demostrar que los electrodos metálicos no recubiertos descritos anteriormente son suficientes para la medición cuando se usan ondas sinusoidales de alta frecuencia como señales de entrada para los microelectrodos. Ni siquiera a 10 V de pico a pico las ondas de 10 a 100 kHz inician la formación de burbujas en la alícuota de la muestra de película lagrimal que se está midiendo. Esto puede deberse al hecho de que dentro de este intervalo de frecuencias existe un equilibrio entre la polarizabilidad del agua y la movilidad iónica, lo que da lugar a oscilaciones de iones en vez de a un movimiento en masa. Esto resuelve muchos problemas de electrolisis y otros problemas de los electrodos de CC. Sin embargo, cuando se aplica un líquido de muestra, las geometrías de los electrodos, tales como picos metálicos o bordes rugosos, pueden provocar la formación de burbujas y echar a perder la medición. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos efectos, resulta útil comenzar cada prueba con un patrón de calibración de uno o dos puntos antes del uso.
- 25 **[0090]** La figura 14 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento para la calibración de un dispositivo de medición de la osmolaridad con un líquido patrón. En la zona 1502 se proporciona una curva de calibración en una memoria y se asume que la curva de calibración es una línea recta. Un punto de la recta se obtiene asumiendo que, cuando las propiedades eléctricas medidas del patrón son iguales a cero, la osmolaridad del patrón es igual a cero. Las propiedades eléctricas (es decir, la transformada de Fourier de una onda sinusoidal, etc.) en el extremo alto del intervalo de concentraciones, de alrededor de 500 mOsms, se pueden predefinir en la memoria en base a las propiedades eléctricas conocidas para un líquido con una concentración conocida.
- 30 **[0091]** En la zona 1504 se puede depositar un líquido patrón sobre el conjunto de microelectrodos de un dispositivo de medición, y se pueden medir las propiedades eléctricas del patrón en la zona 1504. Los procedimientos para medir las propiedades eléctricas del líquido patrón pueden incluir los procedimientos descritos anteriormente para la medición de las propiedades eléctricas de un líquido de muestra. Después, se puede configurar un dispositivo de procesamiento para correlacionar las propiedades eléctricas medidas con un valor de osmolaridad y, por ejemplo, almacenar la medición de la osmolaridad del líquido patrón en la memoria.
- 35 **[0092]** En una realización, el líquido patrón que se añade en la zona 1504 comprende una alícuota pequeña, por ejemplo de 1 µl, de agua desionizada. La medición de la osmolaridad del agua desionizada se puede registrar como límite inferior en la curva de calibración, puesto que el agua desionizada muestra un carácter osmótico mínimo. En una realización, se usa una calibración de un solo punto de manera que todo el rango de la escala de medición del
- 40
- 45
- 50
- 55

dispositivo se pueda extrapolar en base a la diferencia entre la osmolaridad esperada del agua desionizada y la osmolaridad real medida del patrón. En la zona 1506, el dispositivo de procesamiento determina un factor de calibración para ajustar la pendiente de la escala de medición a la curva de calibración. Además, todos los ajustes de la pendiente de la escala de medición se realizan con el líquido medido por pareja de electrodos, de manera que el valor final de cada pareja de electrodos es equivalente a todos los demás. El factor de calibración final se puede almacenar después en la memoria.

[0093] Una vez determinado el factor de calibración, se puede dejar que el patrón se evapore del conjunto de microelectrodos en la zona 1508. La evaporación puede ser necesaria para evitar que el patrón se mezcle con el líquido de muestra y lo corrompa. El agua desionizada proporciona un patrón ejemplar cuando el agua desionizada presenta un contenido en sal tan bajo que después de la evaporación no se encuentran cristales de sal depositados sobre el chip.

[0094] En una realización en la que no quedan cristales de sal después de la evaporación del patrón, el líquido de muestra que se ha de ensayar se puede depositar después sobre el conjunto de microelectrodos del dispositivo de medición en la zona 1510. El conjunto de microelectrodos transfiere energía al líquido de muestra y permite detectar las propiedades eléctricas del líquido de muestra, las cuales se asignan a una medición de osmolaridad en la zona 1512 como se ha descrito anteriormente. En la zona 1514 se puede configurar un dispositivo de procesamiento para ajustar la medición de osmolaridad en base al factor de calibración determinado previamente. El uso del factor de calibración da como resultado una medición de osmolaridad que es sustancialmente independiente de las variaciones de la geometría del conjunto de microelectrodos.

[0095] El procedimiento de la figura 14 también se puede combinar con el procedimiento más sencillo de la figura 13, con el fin de mejorar la precisión.

[0096] La figura 15 es un diagrama de flujo que ilustra otra realización de un procedimiento para la calibración de un dispositivo de medición de la osmolaridad usando un líquido patrón que es una solución salina. En la zona 1602 se puede proporcionar una curva de calibración en una memoria y se puede asumir que la curva de calibración es una línea recta. Un punto de la recta se obtiene asumiendo que, cuando las propiedades eléctricas medidas del patrón son iguales a cero, la osmolaridad del patrón es igual a cero. Las propiedades eléctricas en el extremo alto del intervalo de concentraciones, de alrededor de 500 mOsm, se pueden predefinir en la memoria en base a las propiedades eléctricas conocidas para un líquido con una concentración conocida.

[0097] En la zona 1604 se puede depositar un líquido patrón en el conjunto de microelectrodos de un dispositivo de medición y se pueden medir las propiedades eléctricas del patrón. Los procedimientos para medir las propiedades eléctricas del patrón pueden incluir, por ejemplo, los procedimientos descritos anteriormente para la medición de las propiedades eléctricas de un líquido de muestra. Después, se puede configurar un dispositivo de procesamiento para correlacionar las propiedades eléctricas medidas con un valor de osmolaridad y almacenar la medición de la osmolaridad del patrón en una memoria.

[0098] En la zona 1606, el dispositivo de procesamiento se puede configurar para determinar un factor de calibración para ajustar la pendiente de la escala de medición a la curva de calibración. Además, todos los ajustes de la pendiente de la escala de medición se pueden realizar con el líquido medido por pareja de electrodos, de manera que el valor final de cada pareja de electrodos es equivalente a todos los demás. El factor de calibración final se puede almacenar después en la memoria.

[0099] En este procedimiento, sin embargo, el patrón puede ser una solución salina simple (NaCl) o una solución salina compleja, por ejemplo con sales de sodio, potasio, calcio y magnesio en relaciones fisiológicas. Sin embargo, cuando la solución salina se evapora en la zona 1608, a menudo quedan sobre la superficie del chip cantidades muy notables de cristales de sal, como se muestra en la figura 16. Cuando esto ocurra, se deberán tener en cuenta los cristales de sal residuales en la medición de osmolaridad siguiente, que se realiza en la zona 1612.

[0100] La figura 17, por ejemplo, muestra una respuesta típica cuando un líquido de muestra se introduce en un conjunto de microelectrodos que no incluye sales residuales. En comparación, la figura 18 muestra la respuesta cuando hay sales residuales en el conjunto de microelectrodos en el momento de introducir el líquido de muestra. La presencia de un cristal de sal altera claramente la respuesta, disminuyendo ésta de forma constante durante un periodo de tiempo antes de enderezarse y entrar en el modo de evaporación estacionario. Como se muestra en la figura 18, la dinámica de segundo orden normal está suprimida. Esto se debe al hecho de que después de colocar la muestra, los cristales de sal residuales comienzan a disolverse en el líquido de muestra. La concentración de sales

residuales en la proximidad del electrodo continuará bajando hasta que su contribución se mezcle uniformemente con la muestra, después de lo cual la curva comenzará a ascender de nuevo debido a la evaporación.

- [0101]** Durante esta respuesta transitoria, los iones que se están disolviendo entre dos electrodos de medición presentarán una conductividad mucho más elevada que en la solución depositada originalmente. La figura 16 también muestra cómo una gota de solución salina mal colocada puede cubrir de forma diferente la superficie del conjunto, lo que significa que la señal entre las parejas de electrodos será muy distinta dependiendo de su proximidad a los cristales de sal.
- 10 **[0102]** Por lo tanto, en otra realización de los sistemas y procedimientos para la calibración de un dispositivo de medición de la osmolaridad, se puede configurar un dispositivo de procesamiento para eliminar matemáticamente los efectos de cualquier cristal de sal residual de la medición de osmolaridad de la muestra en la zona 1614. Los efectos de los cristales de sal residuales se pueden anular, por ejemplo, integrando las curvas descendentes de cada pareja de electrodos, lo que estima la cantidad de sal añadida a la solución. La estimación de la cantidad de sal que se añade se realiza sumando solo el área sobre la línea del estado estacionario, que se determina mediante una regresión lineal lejos del momento de suministro de la muestra. Estos efectos se restan después del volumen total de la muestra. Como se ha comentado previamente, el volumen total de la muestra la puede estimar el dispositivo de procesamiento en base el número de electrodos que están en contacto con la muestra.
- 20 **[0103]** En base a estos parámetros se ajusta directamente la concentración medida de la muestra. La concentración de la muestra se basa en el número de iones por unidad de volumen. La medición de la osmolaridad proporciona el número total de iones procedentes de la muestra más los cristales de sal residuales, y el dispositivo de procesamiento estima el volumen de la muestra. Por consiguiente, el ajuste requiere la sustracción del número de iones de sal residuales del número de iones totales medido en la muestra. El número de iones de sal residuales se determina mediante el procedimiento de integración antes comentado. Este procedimiento permite usar una solución salina patrón a microescala sin necesidad de un costoso hardware de lavado. Una vez restado el efecto de la sal residual, el dispositivo de procesamiento ajusta la medición de osmolaridad resultante en base al factor de calibración determinado previamente en la zona 1514. El uso del factor de calibración da como resultado una medición de la osmolaridad que es sustancialmente independiente de las variaciones de la geometría del conjunto de microelectrodos.
- 30 **[0104]** La figura 19 es un diagrama de flujo que ilustra otra realización más de un procedimiento para la calibración de un dispositivo de medición de la osmolaridad con un líquido patrón de acuerdo con los sistemas y procedimientos descritos en la presente memoria. En la realización de la figura 19 se puede usar un lavado junto con la aplicación de un líquido patrón. Los pasos realizados en las zonas 1902, 1904 y 1906 se han comentado previamente y dan lugar a la determinación de un factor de calibración basado en la medición de uno o más patrones. En una realización, el patrón contiene una solución salina simple (NaCl) o una solución salina compleja con sales de sodio, potasio, calcio y magnesio en relaciones fisiológicas.
- 35 **[0105]** En la zona 1908 se realiza la acción de retirar el patrón del chip antes de que el patrón se evapore y evitar la acumulación de sales residuales en el chip. En una realización, se usa en el paso de lavado una cámara microfluídica conectada en serie al sustrato receptor de muestras para permitir el flujo de una corriente constante de agua desionizada por la superficie del chip. Una vez depositada una alícuota del patrón, bien a través de un canal de flujo microfluídico perpendicular o bien mediante procedimientos manuales, y realizada la medición de calibración, el aparato de lavado hará fluir agua desionizada por la superficie de los electrodos hasta que la conductividad alcance el estado estacionario correspondiente a los niveles de agua desionizada esperados. La conductividad en estado estacionario indica que la superficie del chip está limpia de cualquier patrón y está lista para aceptar una muestra. El flujo se detiene y el agua desionizada se deja evaporar sobre la superficie del chip, idealmente sin dejar cristales de sal.
- 40 **[0106]** En otra realización, se puede aplicar un suministro de aire a alta presión con válvula para eliminar el patrón. El tubo se conecta al suministro de aire y se coloca próximo al sustrato receptor y en ángulo agudo respecto a la superficie. El ángulo es tal que una rápida descarga de aire del tubo despeja completamente el sustrato de cualquier líquido presente en la superficie del chip. El flujo de aire se activa después de completar la medición de calibración. El flujo de aire resultante se puede pulsar varias veces hasta que la señal en cada pareja de electrodos haya retornado a los valores de circuito abierto. En otra realización, el suministro de aire se combina con la etapa de lavado microfluídico para no tener que evaporar los líquidos de la superficie del chip.
- 45 **[0107]** Además, si a la superficie del chip está unido un aparato de lavado completo, se pueden realizar

calibraciones con múltiples puntos depositando o haciendo circular agua desionizada y soluciones salinas de concentraciones crecientes sobre la superficie del chip y usando a continuación una descarga de aire para despejar el conjunto. En las zonas 1912 y 1914 se deposita el líquido de muestra sobre el conjunto de microelectrodos y la medición calibrada de la osmolaridad se completa mediante los procedimientos comentados previamente.

5

[0108] Normalización de biomarcadores

[0109] En la mayoría de los pacientes que sufren del síndrome del ojo seco (DES), alergia ocular, infecciones generales u oculares, blefaritis, diabetes o de otras enfermedades en las que se encuentran ADN u otros biomarcadores moleculares en las lágrimas existe la clara necesidad clínica de poder analizar cantidades del orden de nanolitros de lágrimas recogidas del lago lagrimal inferior.

10

[0110] Las muestras de lágrimas del orden de nanolitros son necesarias para minimizar el tiempo de permanencia de un dispositivo colector dentro del lago lagrimal, lo que reduce la probabilidad de inducir un lagrimeo reflejo, una situación en la que se secretan lágrimas hipoosmolares (menos concentradas, muy aguadas) a la superficie ocular, reduciendo de este modo las concentraciones disponibles de biomarcadores e introduciendo una variabilidad diagnóstica en la rutina clínica. Puesto que la cantidad de lagrimeo reflejo es específico de la patología y específico del paciente, el grado de dilución varía con la estimulación. Históricamente, los protocolos de recogida de lágrimas sugerían recoger volúmenes relativamente grandes de lágrimas, típicamente varios microlitros de lágrimas, con el fin de recoger un volumen de muestra suficiente para realizar las pruebas diagnósticas *in vitro* convencionales. Estos ensayos de biomarcadores con frecuencia suponen más de treinta minutos de extracción continua de muestras de lágrimas para conseguir unos volúmenes tan grandes. Los pacientes mayores, y especialmente aquellos que padecen el DES, presentan a menudo menos de 200 nl de lágrimas disponibles en el lago lagrimal que se pueden extraer en un tiempo dado. Así, la recogida de lágrimas para las pruebas *in vitro* convencionales es incómoda y moderadamente invasiva.

15

20

25

[0111] Las lágrimas hipoosmolares pueden ser el resultado de una diversidad de estados. En ciertos subtipos del ojo seco se puede dar una superabundancia de lágrimas no lubricantes, conocida como epífora; estos pacientes pueden presentar los conductos nasolagrimales obstruidos, lo que aumenta el tiempo de permanencia de las lágrimas dentro del lago lagrimal.

30

[0112] También se sabe que los pacientes con DES presentan una disfunción de la película lagrimal que puede dar como resultado una lágrima hiperosmolar. En los pacientes con DES la concentración de equilibrio de las lágrimas en estado estacionario está aumentada significativamente, bien por una deficiencia acuosa o bien por una afección de las glándulas de Meibomio. Se sabe que en algunos pacientes con el DES las concentraciones del lago lagrimal en estado estacionario son entre aproximadamente un 30% y un 50% mayores que en las personas normales corregidas respecto a la edad (sujetos sanos). Con frecuencia se ha informado de osmolaridades de 400 mOsm/l medidas en el lago lagrimal de pacientes con un DES grave. También se han observado lágrimas hiperosmolares en portadores de lentes de contacto. Independientemente del material de las lentes de contacto o del tipo de lentes que se lleven, las lentes de contacto rompen la película lagrimal preocular y desplazan la homeostasis de las lágrimas hacia un estado hiperosmolar.

35

40

[0113] Los pacientes post-LASIK y los pacientes con DES también pueden presentar niveles variables de inervación y/o función nerviosa, que afectan a la capacidad de producir el lagrimeo reflejo. Por lo tanto, el diagnóstico *in vitro* realizado en estos tipos de pacientes puede indicar concentraciones de biomarcadores bastante diferentes dependiendo del estado del paciente y de la manera en que se hayan recogido las lágrimas. Existe una clara demanda de procedimientos de diagnóstico *in vitro* que puedan eliminar la variabilidad introducida por la extracción de muestras de lágrimas y por concentraciones hipoosmolares e hiperosmolares de la película lagrimal.

45

[0114] Recientemente, en una nueva clase de tecnologías microfluídicas, se ha reducido considerablemente el volumen requerido para el diagnóstico *in vitro*, pudiéndose usar muestras del orden de submicrolitros para ensayar los biomarcadores en las lágrimas. Puesto que las lágrimas ofrecen una matriz biológica ideal, prácticamente acelular, a partir de la cual se pueden realizar diversos diagnósticos *in vitro*, la recogida de lágrimas puede ser ahora de interés para muchos médicos y profesionales médicos que estén menos familiarizados con el trabajo cerca de la superficie ocular y que puedan provocar, sin saberlo, un lagrimeo reflejo indebido durante la recogida de lágrimas. El lagrimeo reflejo indebido provocado por esta extracción de muestras puede dar lugar a resultados diagnósticos poco precisos. Este problema refuerza la necesidad de disponer de técnicas de medición de las concentraciones de biomarcadores en las lágrimas que sean independientes de la extracción de muestras.

50

55

[0115] De acuerdo con la presente invención, la normalización de los biomarcadores se realiza frente a una osmolaridad medida, con el fin de separar el impacto de la extracción de muestras de lágrimas y de la homeostasis lagrimal específica del paciente de la interpretación de la concentración de biomarcadores en las lágrimas. La normalización proporciona un nivel de biomarcador lagrimal ajustado.

5

[0116] Las mediciones tradicionales de los biomarcadores lagrimales, tales como inmunoglobulinas (IgE, IgA, IgG, IgM), glucosa, niveles de insulina, lactoferrina, lisozima lagrimal, citoquinas, hormonas, metabolitos de hormonas, fenotipos de enfermedades infecciosas, ácidos nucleicos, proteínas o fracciones lipídicas, se realizan sin el análisis simultáneo de la osmolaridad lagrimal. Los medios tradicionales para medir la osmolaridad lagrimal son incompatibles con el análisis de biomarcadores lagrimales. De acuerdo con la presente invención, un sustrato receptor, una región de muestras y un mecanismo de transducción de energía dentro de un canal microfluídico brindan por primera vez la posibilidad de medir la osmolaridad lagrimal en la misma muestra de lágrimas no diluida que el biomarcador. La combinación de una interfaz colectora de lágrimas y un transductor integrados proporciona una ventaja con respecto a la evaporación después de la extracción de la muestra.

10

15

[0117] El cálculo de un nivel de biomarcador lagrimal ajustado se efectúa de la siguiente manera. En general se acepta que la osmolaridad lagrimal normal se encuentra cercana a 300 mOsm/l (con intervalos de 280 a 316 mOsm/l). El nivel de biomarcador lagrimal ajustado se puede obtener mediante la siguiente ecuación:

20 Nivel de biomarcador lagrimal ajustado = (300 mOsm/l x nivel de biomarcador lagrimal medido) / (nivel de osmolaridad lagrimal medido)

El valor definido de 300 mOsm/l se puede sustituir por cualquier intervalo apropiado de niveles de osmolaridad lagrimal. En otra realización, el nivel basal de la osmolaridad lagrimal se puede medir para un paciente específico al comienzo de un estudio, antes del tratamiento, a edad temprana o antes de una cirugía, con el fin de establecer un nivel inicial personalizado de homeostasis lagrimal. Con el paso del tiempo, después de una administración farmacéutica o de una cirugía, el nivel inicial personalizado se puede sustituir por los 300 mOsm/l definidos.

25

[0118] La figura 20 es un diagrama de flujo que ilustra el procesamiento de acuerdo con la técnica de normalización descrita en la presente memoria. Inicialmente, en la zona con el número 2002, se recoge un volumen alícuota (tal como un volumen de lágrima del orden de nanolitros) de líquido de muestra en una región de muestras de un chip de muestras. A continuación, en la zona 2004, se recibe una señal de salida correspondiente a la osmolaridad procedente de la región de muestras que indica las propiedades energéticas del líquido de muestra, estando la señal de salida correspondiente a la osmolaridad correlacionada con la osmolaridad del líquido de muestra. A continuación, en la zona 2006, se recibe una señal de salida correspondiente al biomarcador procedente de la región de muestras que indica las propiedades químicas del líquido de muestra, estando la señal de salida correspondiente al biomarcador correlacionada con la concentración de biomarcador en el líquido de muestra. A continuación, en la zona 2008, la señal de salida correspondiente a la osmolaridad se procesa para generar un valor de osmolaridad para el líquido de muestra, y la señal de salida correspondiente al biomarcador se procesa para generar un valor de concentración del biomarcador para el líquido de muestra. El procesamiento se puede realizar simultánea o sucesivamente. Por último, en la zona 2010, se determina el nivel de biomarcador ajustado, el cual proporciona una normalización de los valores de concentración del biomarcador. Como se ha señalado anteriormente, el nivel ajustado proporciona una normalización de los valores de concentración del biomarcador y puede corregir con respecto a la homeostasis lagrimal específica del paciente y la variación inducida por el clínico en la extracción de muestras de lágrima en relación con la obtención del líquido de muestra.

30

35

40

45

[0119] Las operaciones representadas en la figura 20 se pueden realizar mediante cualquiera de las realizaciones del sistema ilustradas en los dibujos (figuras 1 a 11) con un procesador configurado para efectuar las operaciones de normalización descritas en la presente memoria.

50

[0120] Si se desea, también se puede llevar a cabo un ajuste en lazo abierto, en el que no se usa la constante de 300 mOsm/l, como en la ecuación siguiente:

Nivel de biomarcador lagrimal ajustado en lazo abierto = nivel de biomarcador lagrimal medido / (nivel de osmolaridad lagrimal medido)

55

[0121] Una ventaja de usar un valor de osmolaridad inicial convencional o personal para la normalización reside en que el nivel de biomarcador lagrimal ajustado se expresa en las mismas unidades que el nivel de biomarcador lagrimal medido. El ajuste en lazo abierto daría lugar a un nivel de biomarcador / mOsm/l, que podría ser un

parámetro más difícil de interpretar para los clínicos, especialmente si el analito de interés se conoce comúnmente por presentar un intervalo en unidades no normalizadas.

[0122] Se pueden obtener niveles de biomarcador lagrimal ajustados similares usando ajustes lineales, logarítmicos, exponenciales o mediante el uso de una curva de calibración. Por ejemplo, un nivel de biomarcador lagrimal ajustado lineal podría tomar la forma dada por:

$$\text{Nivel de biomarcador lagrimal ajustado lineal} = B_{aj} = B_m \times (1 + (\text{alfa} \times (\text{Osm}_m - 300 \text{ mOsm/l})))$$

10 en la que B_{aj} es el nivel de biomarcador lagrimal ajustado lineal, B_m es el nivel de biomarcador medido, alfa es el factor de corrección lineal y Osm_m es la osmolaridad medida. Los puntos alfa y 300 mOsm/l se pueden alterar para ajustarse a la curva de biomarcador específica.

[0123] Se sugiere que la IgE, por ejemplo, se encuentra en el intervalo del orden de 50 a 60 ng/ml en individuos no sensibilizados y de 100 a 300 ng/ml en pacientes con conjuntivitis vernal, estacional o perenne (véanse las publicaciones de Nomura "Tear IgE Concentrations in Allergic Conjunctivitis" en Eye, vol. 12 (parte 2), 1998, 296-98; y Allansmith, "Tissue, Tear, and Serum IgE Concentrations in Vernal Conjunctivitis" en Am. J. of Ophthalmology, vol. 81, n°4, 1976, 506-11). De Nomura:

20 Las concentraciones de IgE en las lágrimas mostraron aumentos significativos en los grupos de queratoconjuntivitis vernal (322,2 +/- 45,7 ng/ml), conjuntivitis alérgica estacional (194,7 +/- 21,7 ng/ml) y conjuntivitis alérgica perenne (134,8 +/- 23,1 ng/ml) en comparación con los controles (52,1 +/- 9,7 ng/ml, $p < 0,01$). No se encontró una diferencia significativa entre los grupos de queratoconjuntivitis epidémica (97,2 +/- 11,7 ng/ml) y conjuntivitis bacteriana (92,6 +/- 13,8 ng/ml) y los controles ($p = 0,1$).

25 **[0124]** Para los pacientes con DES con una osmolaridad elevada de 400 mOsm/l, la determinación no normalizada de los niveles de IgE en lágrimas puede conducir fácilmente a una interpretación incorrecta. Una conjuntivitis bacteriana más grave se puede confundir fácilmente con una conjuntivitis alérgica perenne relativamente leve en base a la IgE no normalizada. De forma similar, si un paciente normal con una conjuntivitis alérgica estacional se hiperestimula durante la recogida de lágrimas y produce lágrimas reflejo hipoosmolares, sus niveles de IgE en lágrimas podrían caer fácilmente bajo las indicaciones de una conjuntivitis alérgica perenne. La normalización mediante la osmolaridad lagrimal medida evita este tipo de falsos diagnósticos.

35 **[0125]** En una realización, una pluralidad de electrodos contenidos en la región de muestras del sustrato receptor se puede funcionalizar con diferentes mecanismos de transducción de energía; un conjunto de electrodos contendría un transductor de osmolaridad (por ejemplo, un electrodo metálico no polarizante para el análisis de impedancia de la osmolaridad, como oro, platino y similares, y un polímero conductor, tal como polipirrol, poliacetileno, polianilina y similares) con otro conjunto de electrodos configurado en forma de un transductor electroquímico para un biomarcador específico (por ejemplo, un ensayo en sándwich o competitivo que comprende un electrodo metálico no recubierto o recubierto con un polímero conductor con una química superficial correspondiente para la unión de anticuerpos, Avibody, aptámeros u otros receptores para un ligando biomarcador). En esta realización, la osmolaridad está multiplexada en el espacio. En la figura 21, que es una vista en planta del sustrato receptor 2100 que muestra la región de muestras 2102, se muestra un ejemplo de esta realización. En la figura 22 se proporciona una vista detallada de los electrodos 2104 en la región de muestras 2102. Los electrodos 2104 ilustrados indican un grupo de electrodos demarcados en la región de muestras como grupo "A" con la función de biomarcador y electrodos de osmolaridad de oro demarcados en la región de muestras como grupo "B" para la función de osmolaridad. Un capilar 2106 recibe el líquido de muestra y distribuye el líquido a lo largo de su longitud para interactuar con los electrodos A y B.

50 **[0126]** Después de depositar un volumen alícuota del líquido de muestra en la región de muestras de un sustrato (por acción capilar, aspiración o técnicas similares), la energía transmitida al líquido de muestra se transduce en la región de muestras para generar una señal de salida que indica las propiedades energéticas del líquido de muestra que se correlacionan con la osmolaridad del líquido de muestra. Simultáneamente o en operaciones paralelas se usan procedimientos potenciométricos, amperométricos, voltametría de pulsos, voltametría cíclica, respuesta a 55 frecuencias de banda ancha, impedancia u otros procedimientos electroquímicos para transducir las señales de salida de los electrodos modificados electroquímicamente para indicar las propiedades químicas del líquido de muestra que están correlacionadas con la concentración de biomarcadores en las lágrimas. Así, las señales de salida correspondientes a la osmolaridad y al biomarcador se generan al mismo tiempo pero a partir de diferentes conjuntos de electrodos. Seguidamente se calcula un nivel de biomarcador lagrimal ajustado para compensar la

posible hiperosmolaridad del paciente o dilución introducida durante la extracción de la muestra de lágrima. Es decir, el nivel de biomarcador lagrimal ajustado puede compensar y corregir con respecto a la homeostasis lagrimal específica del paciente y la variación inducida por el clínico en la extracción de muestras de lágrima en relación con la obtención del líquido de muestra.

5

[0127] En otras realizaciones en las que la osmolaridad está multiplexada en el espacio, se depositan indicadores ópticos, tales como una pluralidad de esferas a nanoescala que presentan una luminiscencia correlacionada con la osmolaridad del líquido de muestra, sobre un subconjunto de la región de muestras. Otros mecanismos de transducción óptica pueden incluir esferas fluorescentes iontoforéticas a nanoescala o películas metálicas susceptibles a resonancia de plasmón superficial. En paralelo se configuran subconjuntos de la región de muestras para generar señales de salida que indican las propiedades químicas del líquido de muestra que están correlacionadas con la concentración de un biomarcador en la lágrima. Los subconjuntos de la región de muestras pueden incluir indicadores luminiscentes, fluorescentes, quimioluminiscentes, de transferencia de energía por resonancia, opto-entrópicos, de espectroscopía Raman de superficie aumentada, colorimétricos, de resonancia de plasmón superficial, plasmónico u otros indicadores ópticos usados comúnmente para la transducción de biomarcadores. Tras la iluminación con una fuente de energía óptica que transfiere energía óptica al líquido de muestra, la energía óptica se puede transducir en la región de muestras para generar una señal de salida óptica que indica las propiedades energéticas y químicas del líquido de muestra que están correlacionadas con la osmolaridad y la concentración del biomarcador lagrimal, respectivamente. Después, un detector óptico recibe la señal de salida óptica de la región de muestras y un dispositivo de procesamiento procesa la señal de salida para realizar una estimación de la osmolaridad y de la concentración de biomarcador en el líquido de muestra. Seguidamente se calcula un nivel de biomarcador lagrimal ajustado para compensar la posible hiperosmolaridad del paciente o dilución introducida durante la extracción de la muestra.

[0128] En otra realización más, se pueden combinar independientemente procedimientos eléctricos, ópticos o térmicos (por ejemplo, depresión del punto de congelación) para la determinación de la osmolaridad en el sustrato receptor con procedimientos eléctricos u ópticos para la detección de la concentración de un biomarcador lagrimal. Por ejemplo, las determinaciones de la osmolaridad a partir de la conductividad se pueden combinar con transductores ópticos para el análisis de biomarcadores lagrimales. El multiplexado espacial tolera múltiples biomarcadores en un formato de este tipo.

[0129] En las realizaciones de multiplexado espacial la medición de la osmolaridad lagrimal se puede realizar al mismo tiempo que los ensayos de biomarcadores o en serie modulando el tipo de energía de entrada.

[0130] Por ejemplo, si tanto el análisis de osmolaridad como el de biomarcadores lagrimales están multiplexados espacialmente mediante procedimientos ópticos, la osmolaridad se puede determinar mediante resonancia de plasmón superficial (es decir, el ángulo sobre una película metálica) y el biomarcador lagrimal se puede analizar por fluorescencia.

[0131] En otra realización, los electrodos cubiertos con un sistema de ensayo competitivo cromogénico se pueden interrogar respecto a la conductividad con el fin de determinar la osmolaridad y, seguidamente, respecto a la absorbancia de luz con el fin de cuantificar la concentración del biomarcador lagrimal.

[0132] Si como marcador de la osmolaridad se usan esferas fluorescentes a nanoescala y para transducir la concentración del biomarcador lagrimal se usan anticuerpos reporteros quimioluminiscentes, la primera entrada comprende una luz de excitación apropiada y la segunda entrada de energía comprende el bombeo de una concentración conocida del sustrato luminiscente y combustible a través de la región de muestras (por ejemplo, luminol y peróxido de hidrógeno).

[0133] En otra realización, se puede usar una "regla molecular" para transducir la osmolaridad, por ejemplo una pareja plasmónica de esferas metálicas a nanoescala unidas a ADN podría indicar la osmolaridad del líquido de muestra global mediante la detección óptica del cambio en la absorbancia a alrededor de 520 nm. En paralelo, si se usan anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia para marcar el analito de interés, la respuesta fluorescente a la luz de excitación se lee después de la absorbancia de la regla molecular en el mismo líquido.

55

[0134] Se pueden usar otras combinaciones de transducción eléctrica, óptica y térmica para alcanzar los niveles requeridos de sensibilidad, especificidad y multiplexado, minimizando al mismo tiempo la necesidad de lavado o de interconexión externa con la región de muestras.

[0135] Estos procedimientos generalmente son susceptibles al multiplexado espacial en un sentido discreto, en el que los subconjuntos de la región de muestras son ortogonales en el plano superficial. Tales procedimientos también son susceptibles al multiplexado espacial vertical, en el que, por ejemplo, el transductor del biomarcador se construye sobre el transductor de osmolaridad, como en un ensayo de fluorescencia se construye sobre un polímero conductor.

[0136] En otra realización, una pluralidad de electrodos está configurada para la transducción electroquímica del biomarcador de interés y la osmolaridad está multiplexada en el tiempo. En esta realización, todos los electrodos están funcionalizados con la misma química superficial para el ensayo del biomarcador. Puesto que hay un tiempo de difusión asociado a la unión del ligando al biomarcador lagrimal, la osmolaridad se puede determinar inmediatamente después de la introducción en la región de muestras, antes de que los electrodos se vean afectados sustancialmente por la presencia del analito. En una realización, en los ensayos electroquímicos en los que la capa de Debye es modulada por el ensayo del biomarcador lagrimal y se detecta mediante un cambio en la capacitancia del sistema, la lectura inicial se puede correlacionar con la osmolaridad y el cambio dinámico en la capacitancia a lo largo del tiempo puede indicar los niveles del biomarcador lagrimal. Así, las señales de salida correspondientes a la osmolaridad y al biomarcador son generadas por los mismos electrodos pero están separadas en el tiempo, produciéndose la salida correspondiente a la osmolaridad sustancialmente inmediatamente después de la introducción del líquido de muestra en la región de muestras y produciéndose la salida correspondiente al biomarcador después del tiempo de difusión requerido para la región de muestras.

[0137] Otras realizaciones permiten determinar la osmolaridad en un espectro de frecuencias diferente del ensayo de biomarcadores. Por ejemplo, la osmolaridad se puede determinar mediante un espectro de impedancias de 10 a 100 kHz y la concentración del biomarcador lagrimal se puede analizar mediante una medición voltamétrica o amperométrica de baja frecuencia o a CC en estado estacionario. De forma alternativa, la osmolaridad se puede determinar mediante un espectro de impedancias de 10 a 100 kHz y la concentración del biomarcador lagrimal se puede analizar mediante un espectro de nanoestructuras excitado a 100 kHz-GHz o un espectro de adsorción a THz. Para estos análisis se pueden usar otras combinaciones de mediciones electroquímicas pulsadas o sinusoidales, que incluyen la adición de una pequeña señal sinusoidal sobre una entrada de onda cuadrada.

[0138] Otros aspectos de acuerdo con la invención pueden incluir el análisis de la osmolaridad lagrimal y de los biomarcadores lagrimales en cámaras nanofluidicas paralelas y la normalización de unos respecto a otros.

[0139] Otros aspectos más de la invención incluyen la implementación en la que se extraen dos muestras de lágrima separadas que se analizan en serie. Los análisis en serie del biomarcador lagrimal y de la osmolaridad lagrimal proporcionan una estimación indirecta del impacto producido por la extracción de muestras. Es probable que el análisis secuencial, si se realiza apropiadamente, proporcione una mejor indicación de la homeostasis lagrimal que el análisis de biomarcadores no normalizado solo.

[0140] Aunque se hayan descrito anteriormente ciertas realizaciones, se entiende que las realizaciones descritas se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. Por consiguiente, la invención no debe estar limitada por las realizaciones descritas. Mejor dicho, el alcance de la invención descrita en la presente memoria solo debe estar limitado por las reivindicaciones que siguen en combinación con la descripción anterior y los dibujos adjuntos.

REIVINDICACIONES

1. Sistema para la medición de líquidos, comprendiendo el sistema

5 un dispositivo de medición que transfiere energía a un líquido de muestra en un chip de muestras que comprende una región de muestras configurada para contener un volumen alícuota del líquido de muestra recogido en el chip de muestras;

un dispositivo de procesamiento que detecta la energía transferida al líquido de muestra y procesa una señal de salida del chip de muestras correspondiente a la osmolaridad que indica las propiedades energéticas del volumen alícuota del líquido de muestra, en el que la señal de salida del chip de muestras correspondiente a la osmolaridad está correlacionada con la osmolaridad del líquido de muestra, **caracterizado porque** el dispositivo de procesamiento también recibe de la región de muestras del chip de muestras una señal de salida correspondiente al biomarcador que indica las propiedades químicas del líquido de muestra, en el que la señal de salida correspondiente al biomarcador está correlacionada con la concentración del biomarcador en el líquido de muestra, y el dispositivo de procesamiento procesa la señal de salida correspondiente a la osmolaridad para generar un valor de osmolaridad para el líquido de muestra y, después, procesa la señal de salida correspondiente al biomarcador para generar un valor de concentración del biomarcador para el líquido de muestra y determina un nivel de biomarcador ajustado que proporciona una normalización de los valores de concentración del biomarcador en base a un nivel de osmolaridad basal.

2. Sistema para la medición de líquidos según la reivindicación 1, en el que la normalización de los valores de concentración del biomarcador corrige con respecto a la homeostasis lagrimal específica del paciente; o

25 en el que la normalización de los valores de concentración del biomarcador corrige con respecto a la variación inducida por el clínico en la extracción de muestras de lágrima en relación con la obtención del líquido de muestra; o

en el que los análisis de osmolaridad y de los biomarcadores se realizan simultáneamente; o

30 en el que los análisis de osmolaridad y de los biomarcadores se realizan sucesivamente; o

en el que la normalización de los valores de concentración de los biomarcadores es lineal; o

en el que la normalización de los valores de concentración de los biomarcadores es ratiométrica; o

35 en el que la normalización de los valores de concentración de los biomarcadores es exponencial; o

en el que la normalización de los valores de concentración de los biomarcadores está basada en una curva de calibración; o

40 en el que la región de muestras contiene un transductor óptico.

3. Sistema para la medición de líquidos según la reivindicación 1, en el que la región de muestras contiene una pluralidad de electrodos.

45 4. Sistema para la medición de líquidos según la reivindicación 3, en el que la pluralidad de electrodos se compone de un metal no polarizante; o

en el que la pluralidad de electrodos está acoplada a un polímero conductor; o

en el que la pluralidad de electrodos está acoplada a un transductor electroquímico.

50 5. Sistema para la medición de líquidos según la reivindicación 1, en el que:

el dispositivo de procesamiento recibe de la región de muestras una señal de salida correspondiente a la osmolaridad que indica las propiedades energéticas del líquido de muestra, en el que la señal de salida correspondiente a la osmolaridad está correlacionada con la osmolaridad del líquido de muestra;

el dispositivo de procesamiento recibe de la región de muestras una señal de salida correspondiente al biomarcador que indica las propiedades químicas del líquido de muestra, en el que la señal de salida correspondiente al biomarcador está correlacionada con la concentración del biomarcador en el líquido de muestra; y

el dispositivo de procesamiento procesa la señal de salida correspondiente a la osmolaridad para generar un valor de osmolaridad para el líquido de muestra y procesa la señal de salida correspondiente al biomarcador para generar un valor de concentración del biomarcador para el líquido de muestra.

5

6. Sistema para la medición de líquidos según la reivindicación 5, en el que las señales de salida correspondientes a la osmolaridad y al biomarcador están multiplexadas en el espacio; o

10 en el que las señales de salida correspondientes a la osmolaridad y al biomarcador están multiplexadas en el tiempo; o

en el que las señales de salida correspondientes a la osmolaridad y al biomarcador están multiplexadas en frecuencia; o

15 en el que las señales de salida correspondientes a la osmolaridad y al biomarcador están multiplexadas en un mecanismo de transducción.

7. Procedimiento para la medición de un líquido de muestra, comprendiendo el procedimiento:

20 la recepción de una señal de salida correspondiente a la osmolaridad, procedente de una región de muestras de un chip de muestras, de manera que la señal de salida correspondiente a la osmolaridad indica las propiedades energéticas de un volumen alícuota del líquido de muestra recogido en el chip de muestras, en el que la señal de salida correspondiente a la osmolaridad está correlacionada con la osmolaridad del líquido de muestra; **caracterizado por**

25

la recepción de una señal de salida correspondiente al biomarcador, procedente de una región de muestras de un chip de muestras, de manera que la señal de salida correspondiente al biomarcador indica las propiedades químicas del líquido de muestra, en el que la señal de salida correspondiente al biomarcador está correlacionada con la concentración del biomarcador en el líquido de muestra;

30

el procesamiento de la señal de salida correspondiente a la osmolaridad para generar un valor de osmolaridad para el líquido de muestra y el procesamiento de la señal de salida correspondiente al biomarcador para generar un valor de concentración del biomarcador para el líquido de muestra; y

35 la determinación de un nivel de biomarcador ajustado que proporciona una normalización de los valores de concentración del biomarcador en base a un nivel de osmolaridad basal.

8. Procedimiento de medición según la reivindicación 7, en el que la normalización de los valores de concentración del biomarcador corrige con respecto a la homeostasis lagrimal específica del paciente; o

40

en el que la región de muestras contiene un transductor óptico; o

en el que las señales de salida están multiplexadas en el espacio; o

45 en el que las señales de salida están multiplexadas en el tiempo; o

en el que las señales de salida están multiplexadas en frecuencia; o

en el que las señales de salida están multiplexadas en un mecanismo de transducción;

50

en el que la normalización de los valores de concentración del biomarcador corrige con respecto a la variación inducida por el clínico en la extracción de muestras de lágrima en relación con la obtención del líquido de muestra; o

55 en el que el procesamiento de la señal de salida correspondiente a la osmolaridad y el procesamiento de la señal de salida correspondiente al biomarcador se realizan simultáneamente; o

en el que el procesamiento de la señal de salida correspondiente a la osmolaridad y el procesamiento de la señal de salida correspondiente al biomarcador se realizan sucesivamente; o

en el que la normalización de los valores de concentración del biomarcador es lineal; o

en el que la normalización de los valores de concentración del biomarcador es ratiométrica; o

5 en el que la normalización de los valores de concentración del biomarcador es exponencial; o

en el que la normalización de los valores de concentración del biomarcador está basada en una curva de calibración.

9. Procedimiento de medición según la reivindicación 7, en el que la región de muestras contiene una pluralidad de electrodos.

10. Procedimiento de medición según la reivindicación 9, en el que la pluralidad de electrodos se compone de un metal no polarizante,

15 en el que la pluralidad de electrodos está acoplada a un polímero conductor; o

en el que la pluralidad de electrodos está acoplada a un transductor electroquímico.

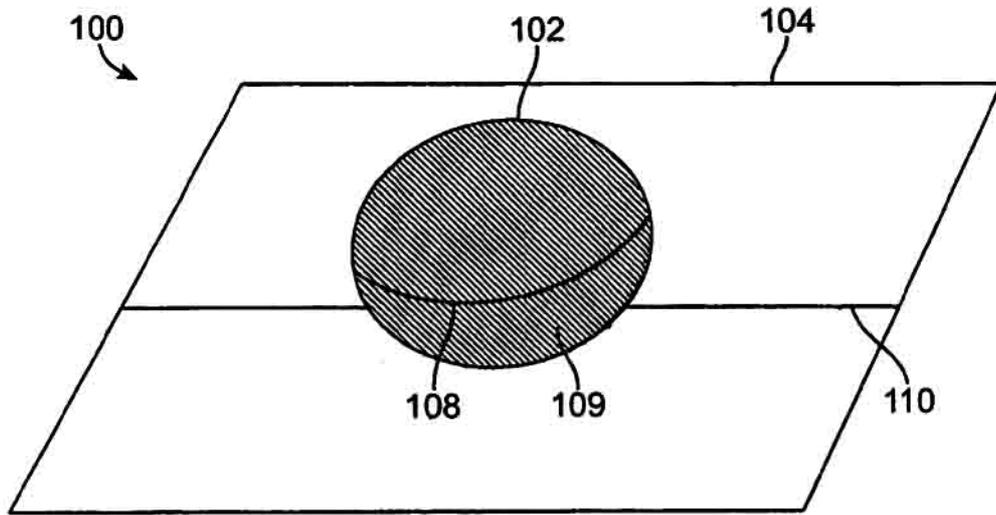


FIG. 1

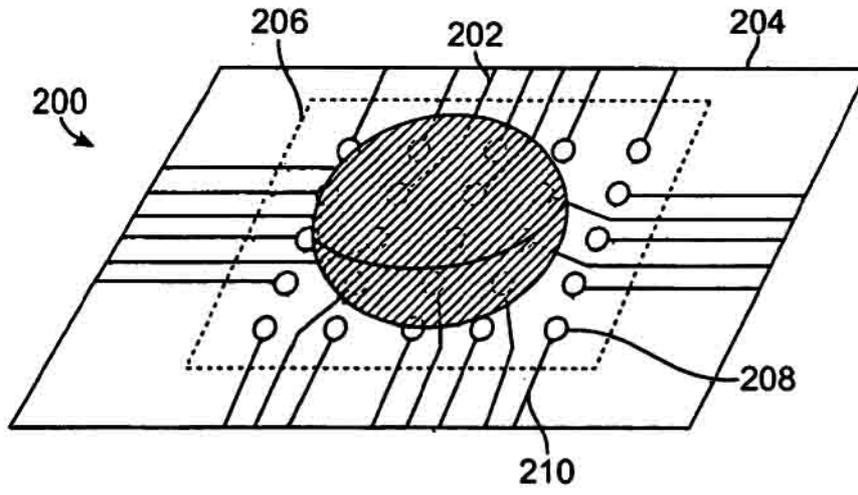


FIG. 2

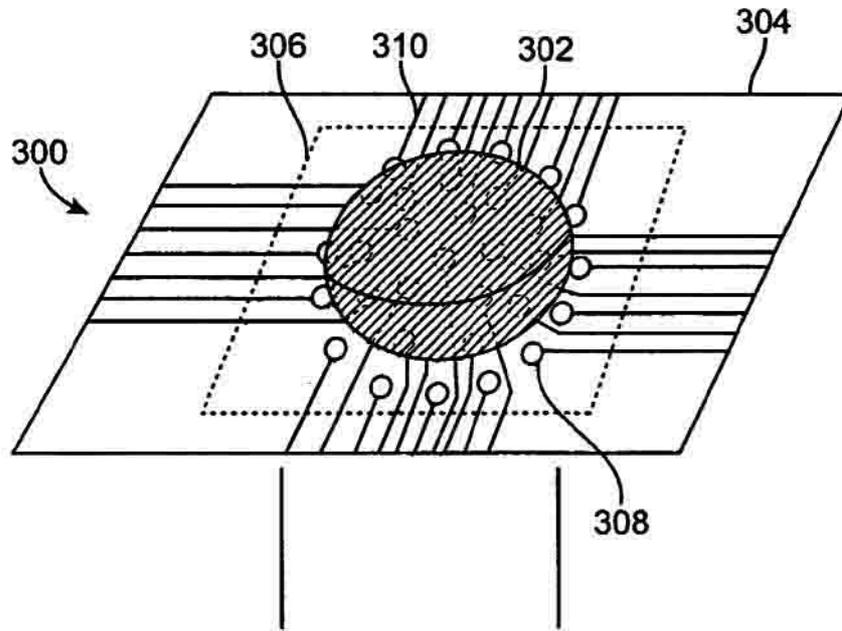


FIG. 3

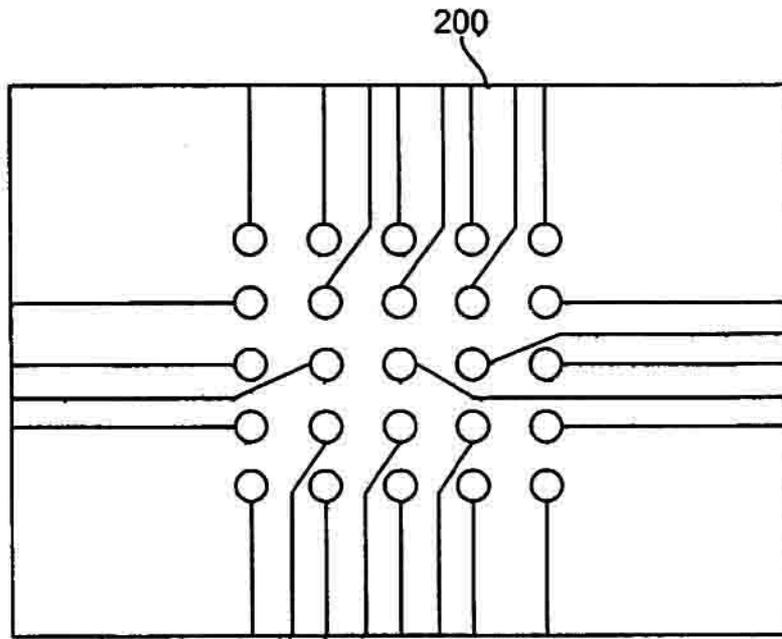


FIG. 4

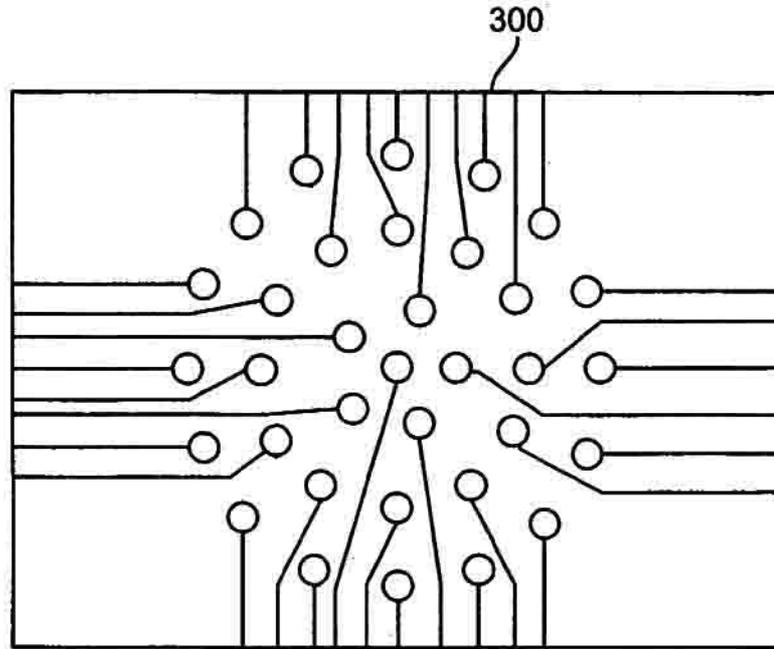


FIG. 5

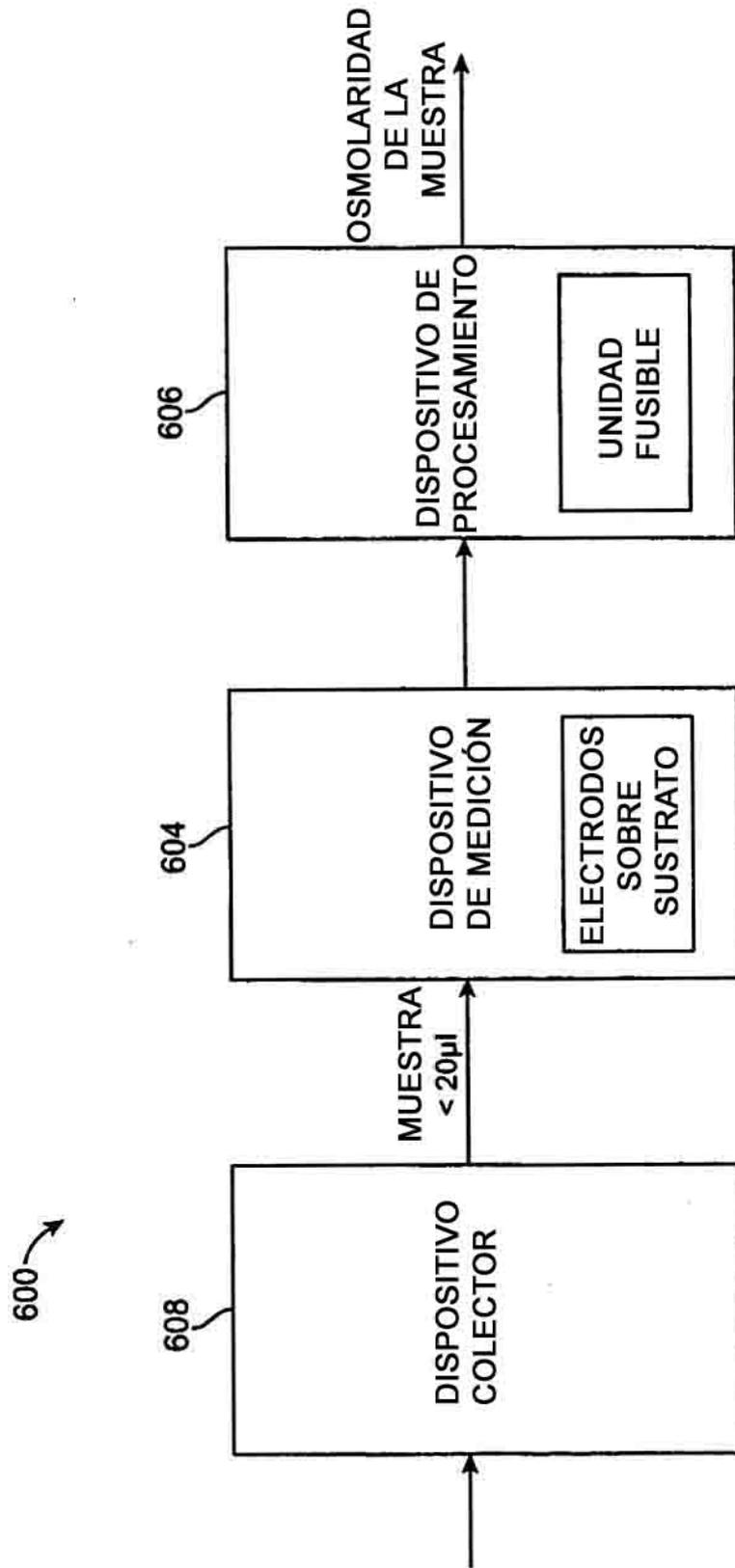


FIG. 6

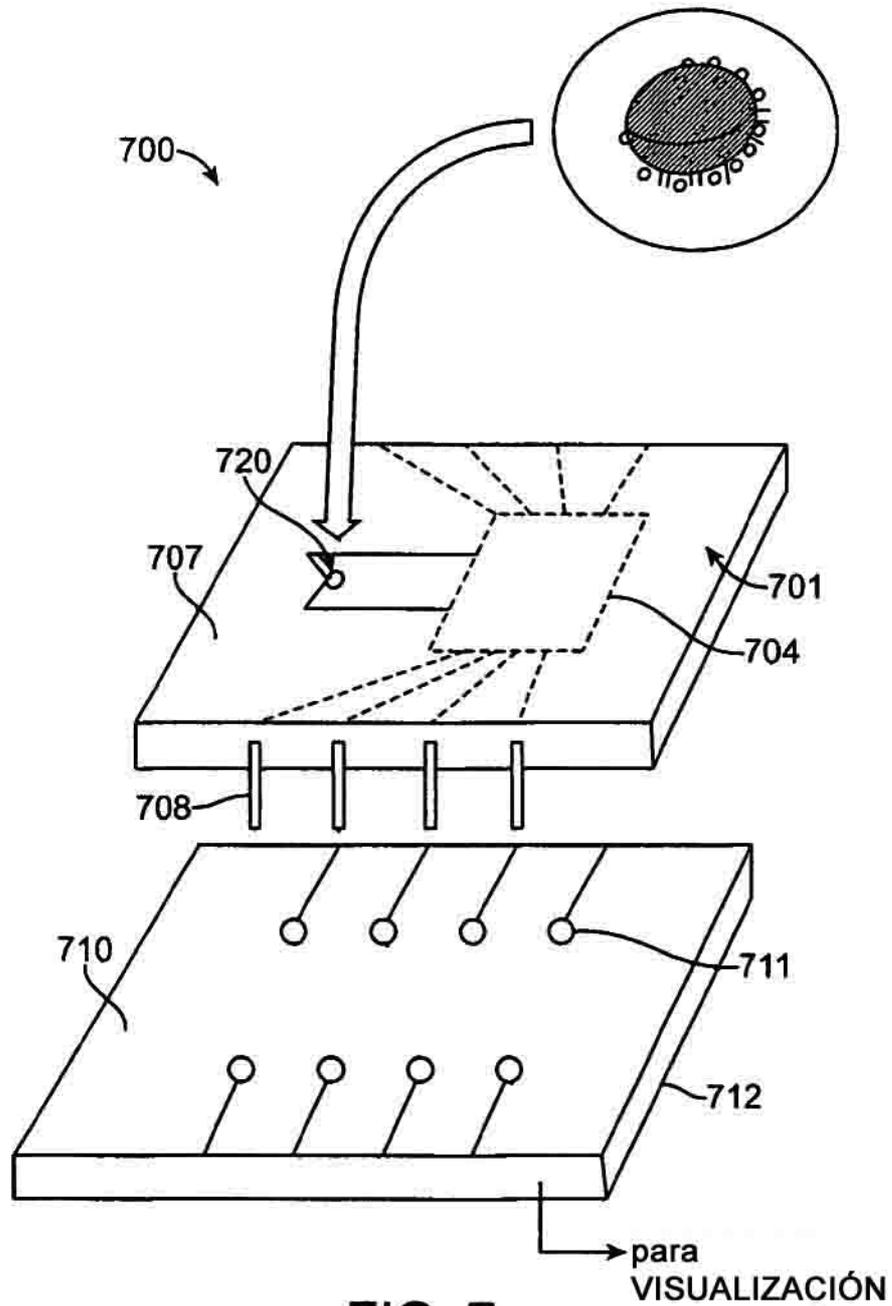


FIG. 7

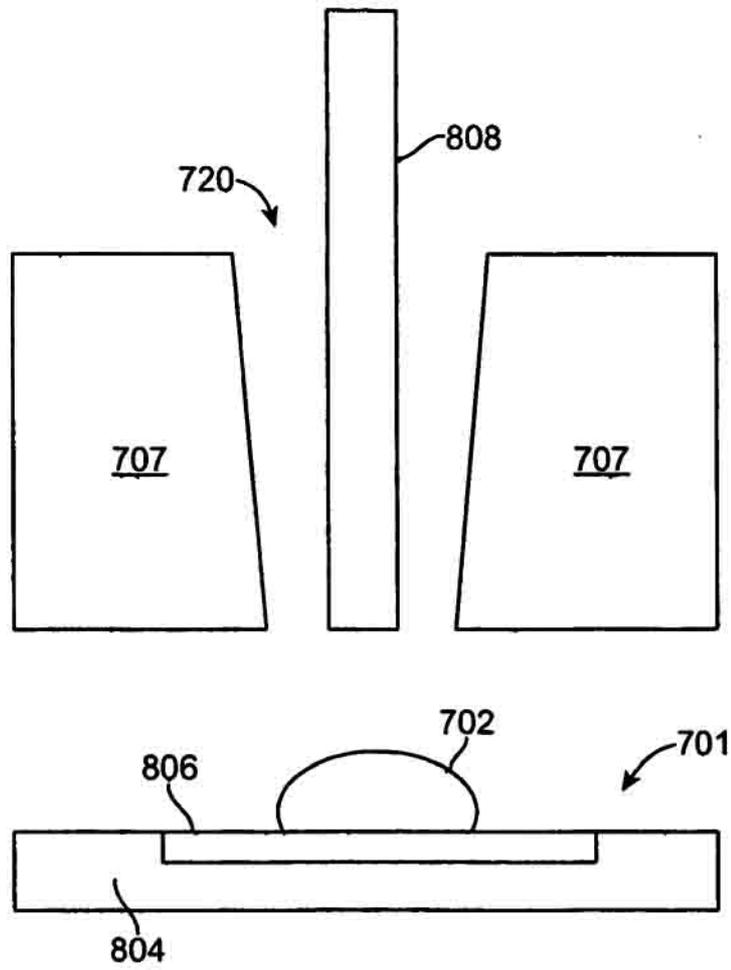


FIG. 8

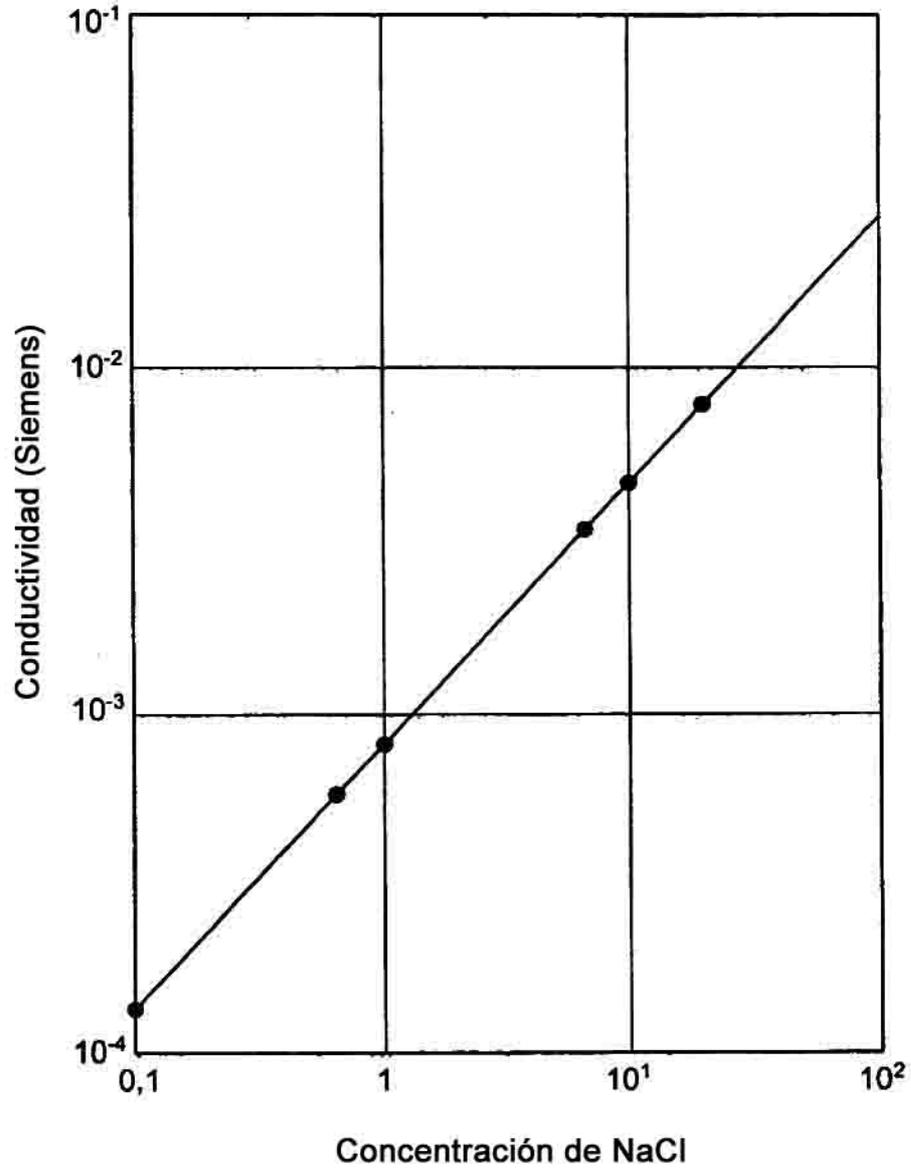


FIG. 9

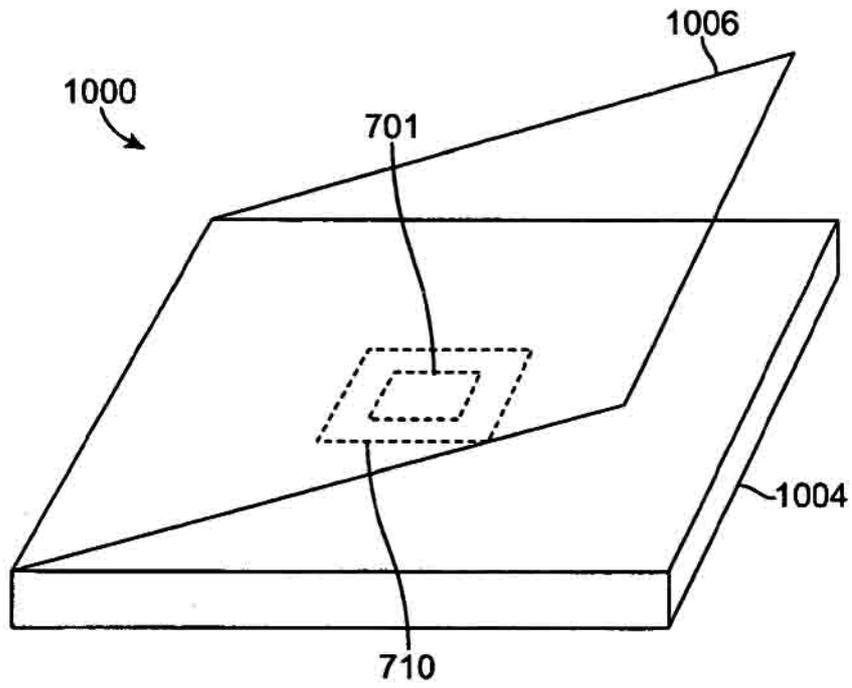


FIG. 10

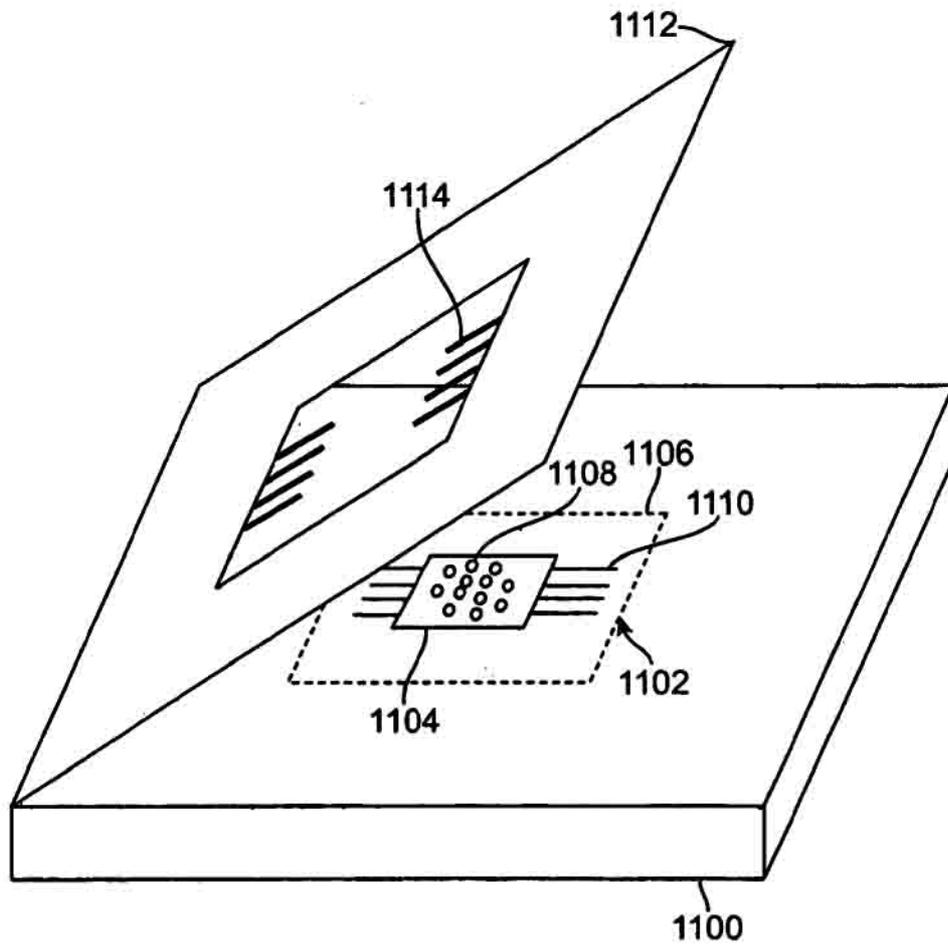


FIG. 11

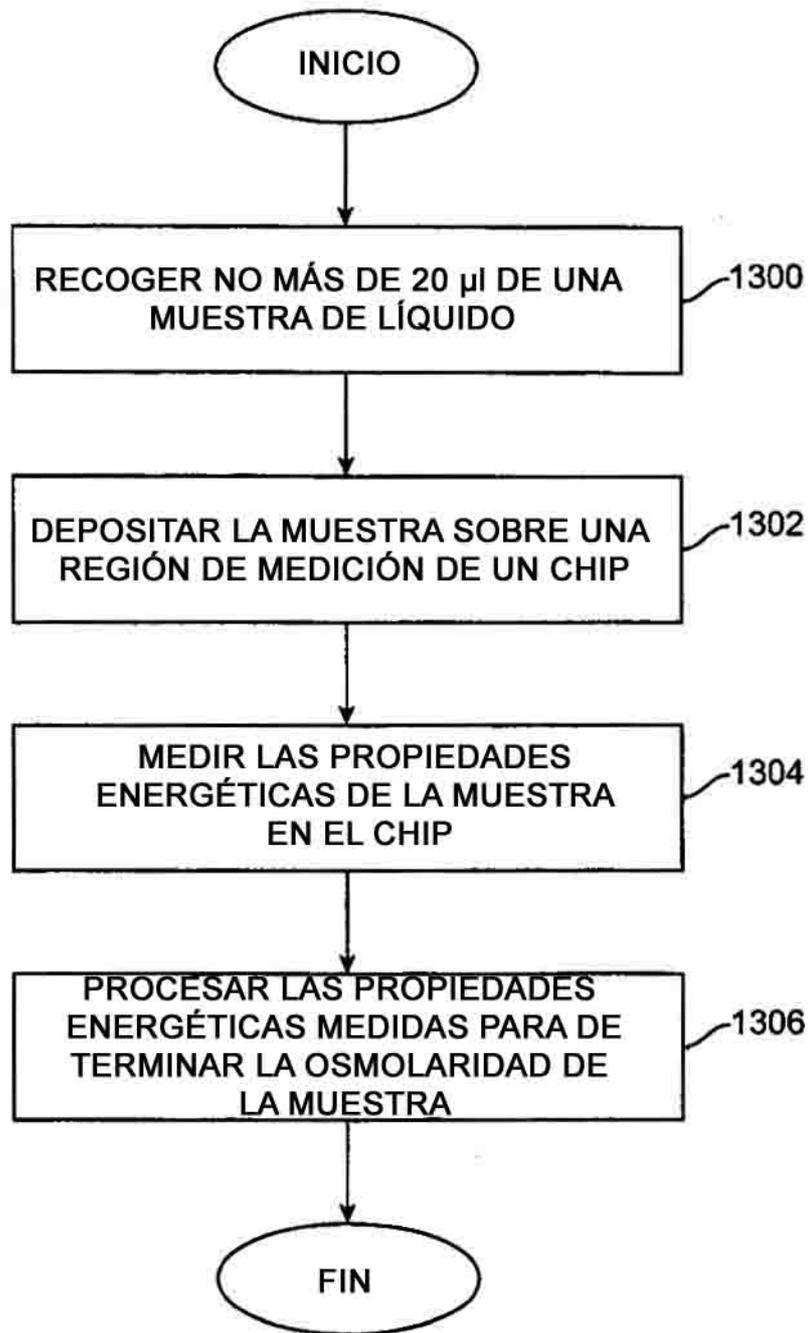


FIG. 12

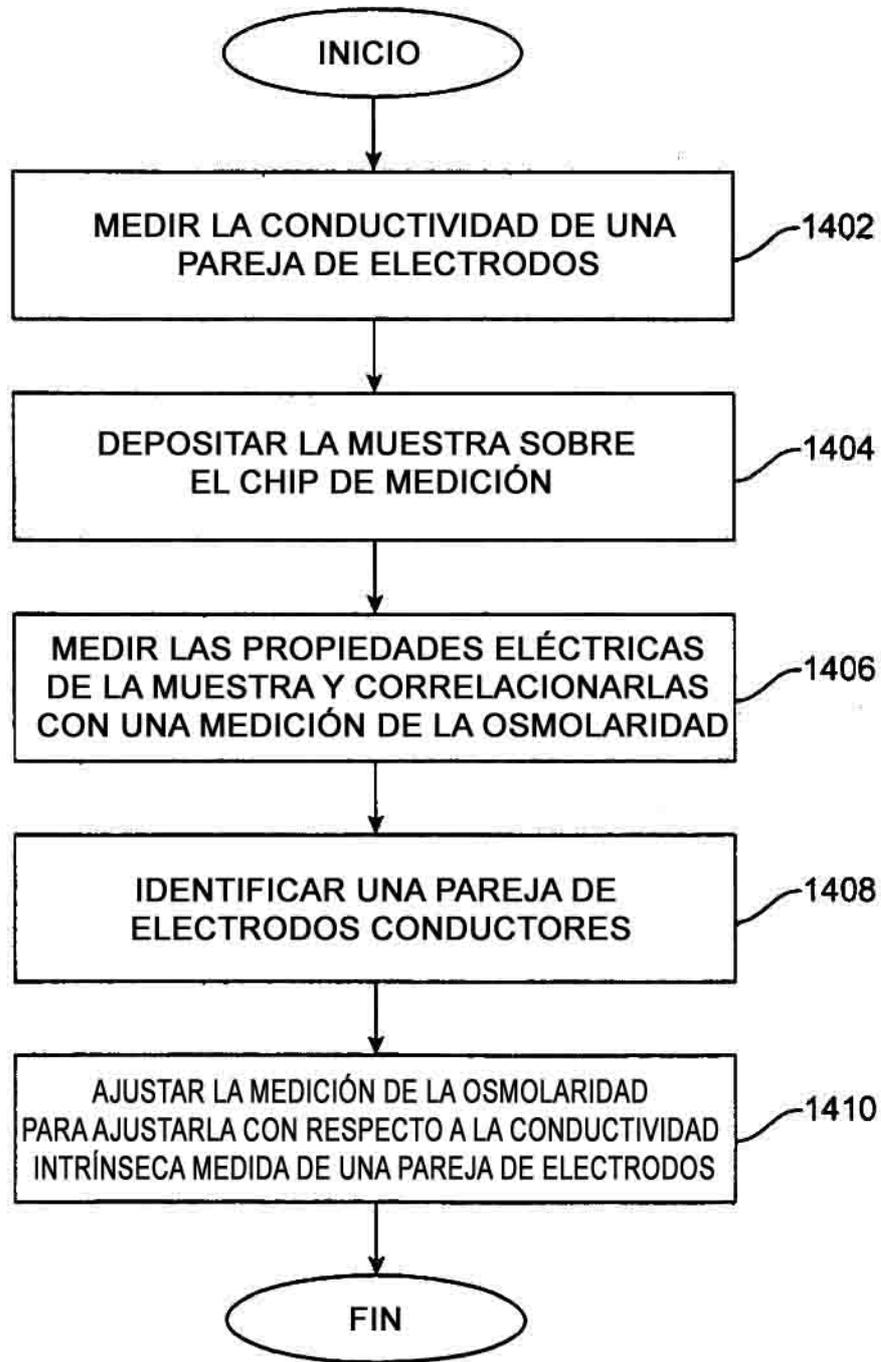


FIG. 13

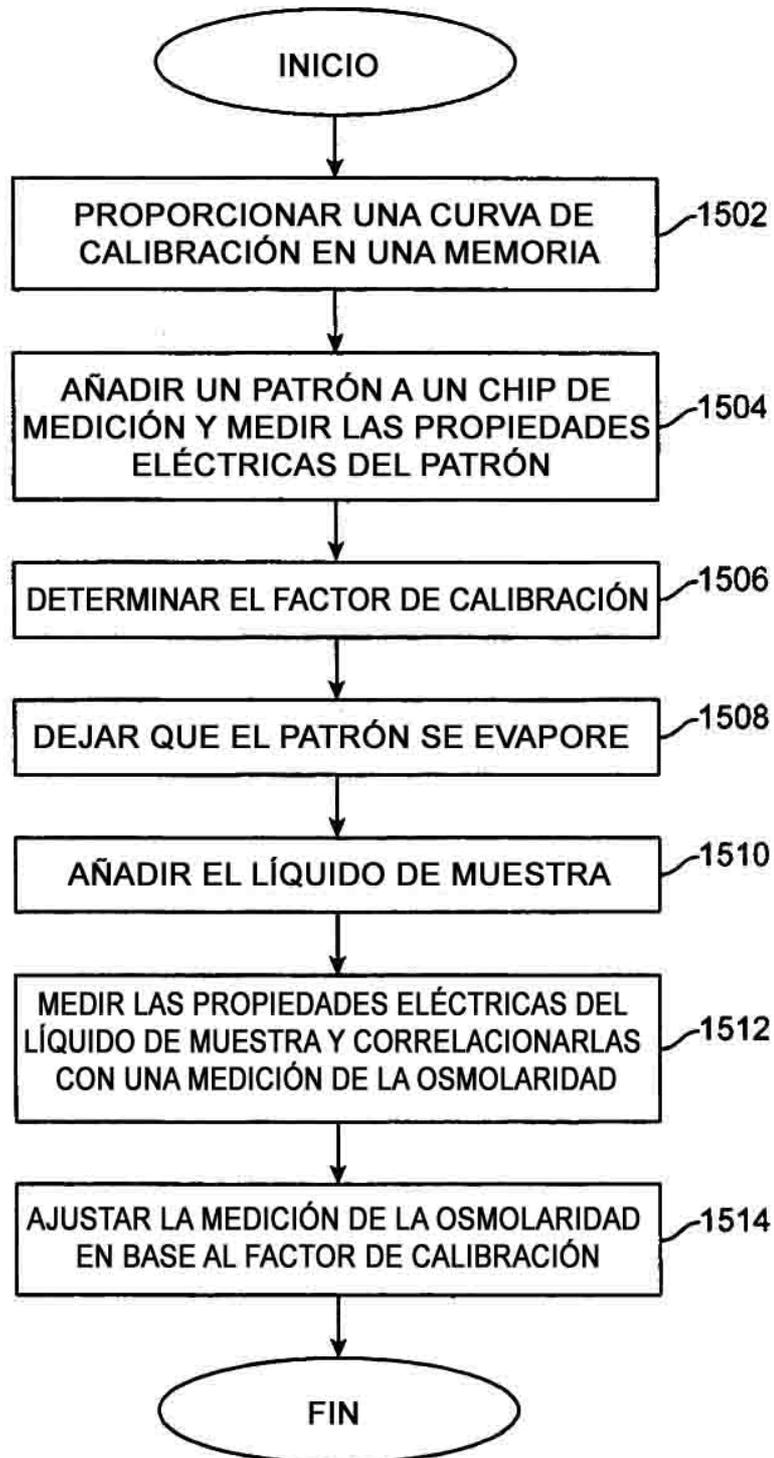


FIG. 14

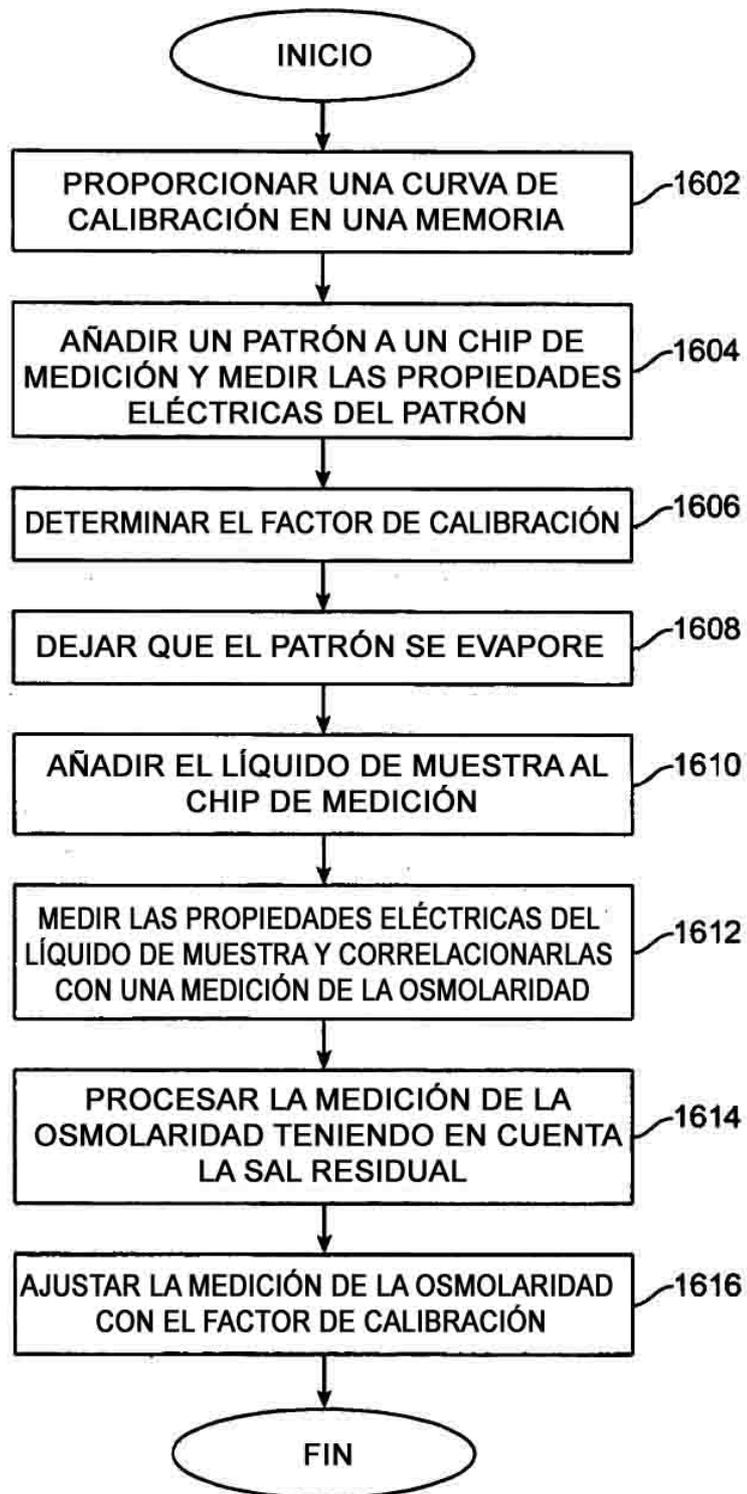


FIG. 15

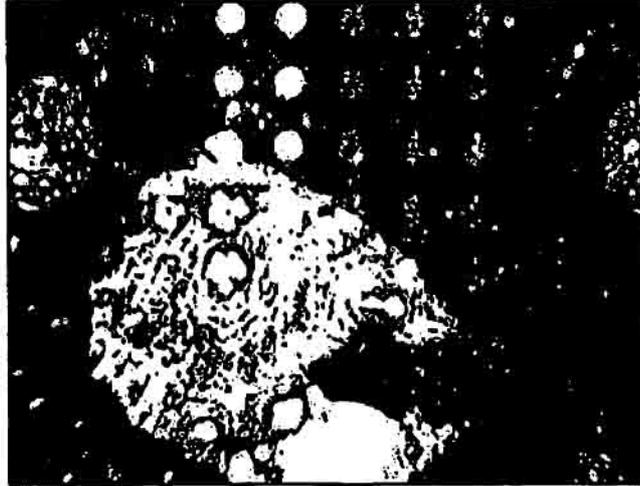


FIG. 16

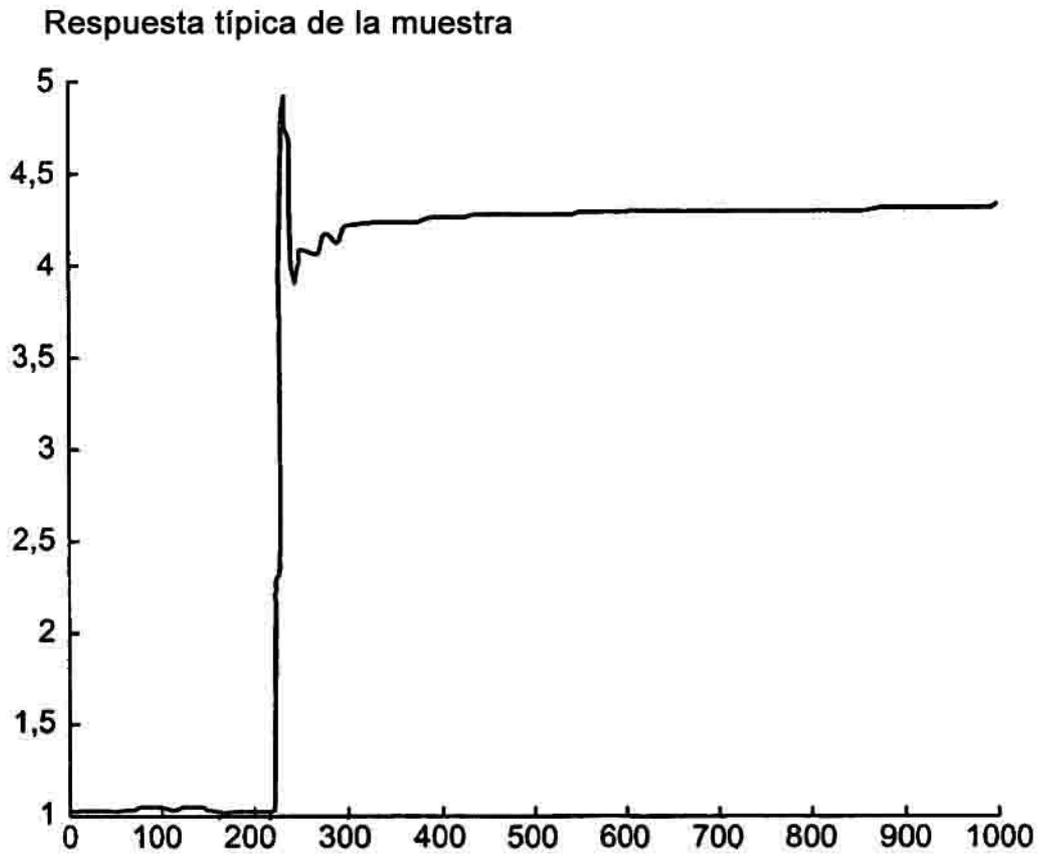


FIG. 17

La disolución de los cristales de sal sobre la línea muestra un gradiente local de concentración

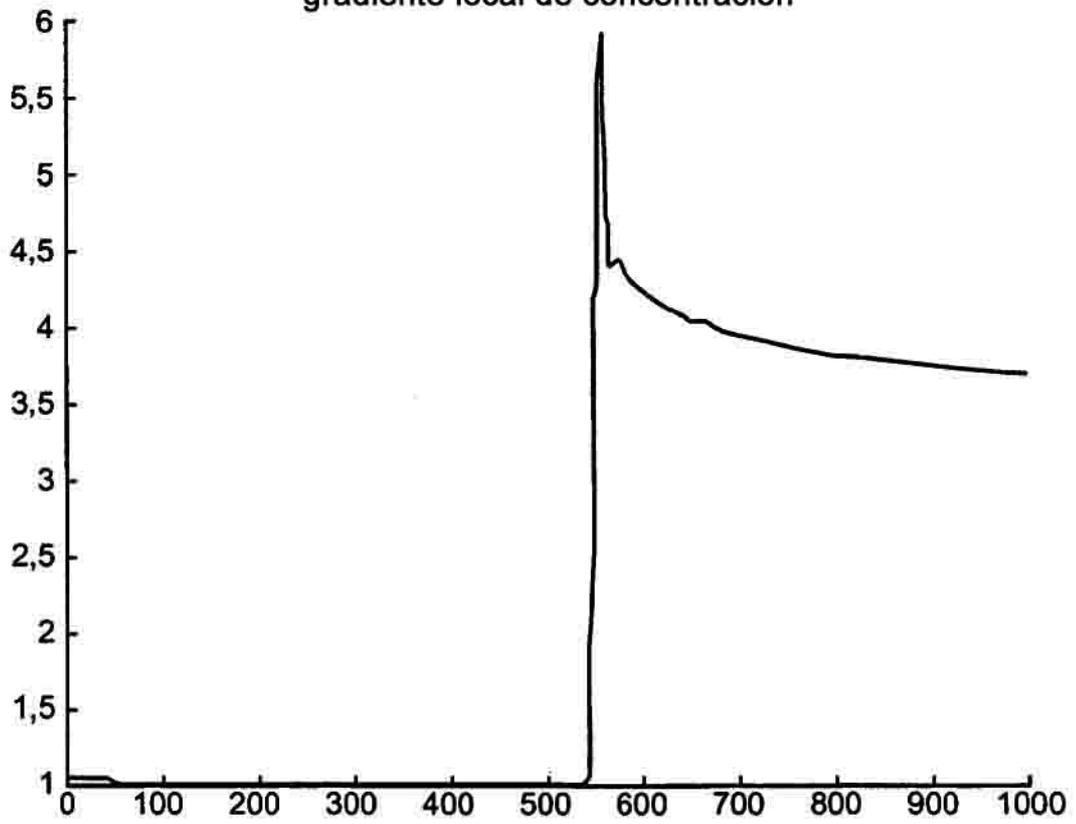


FIG. 18

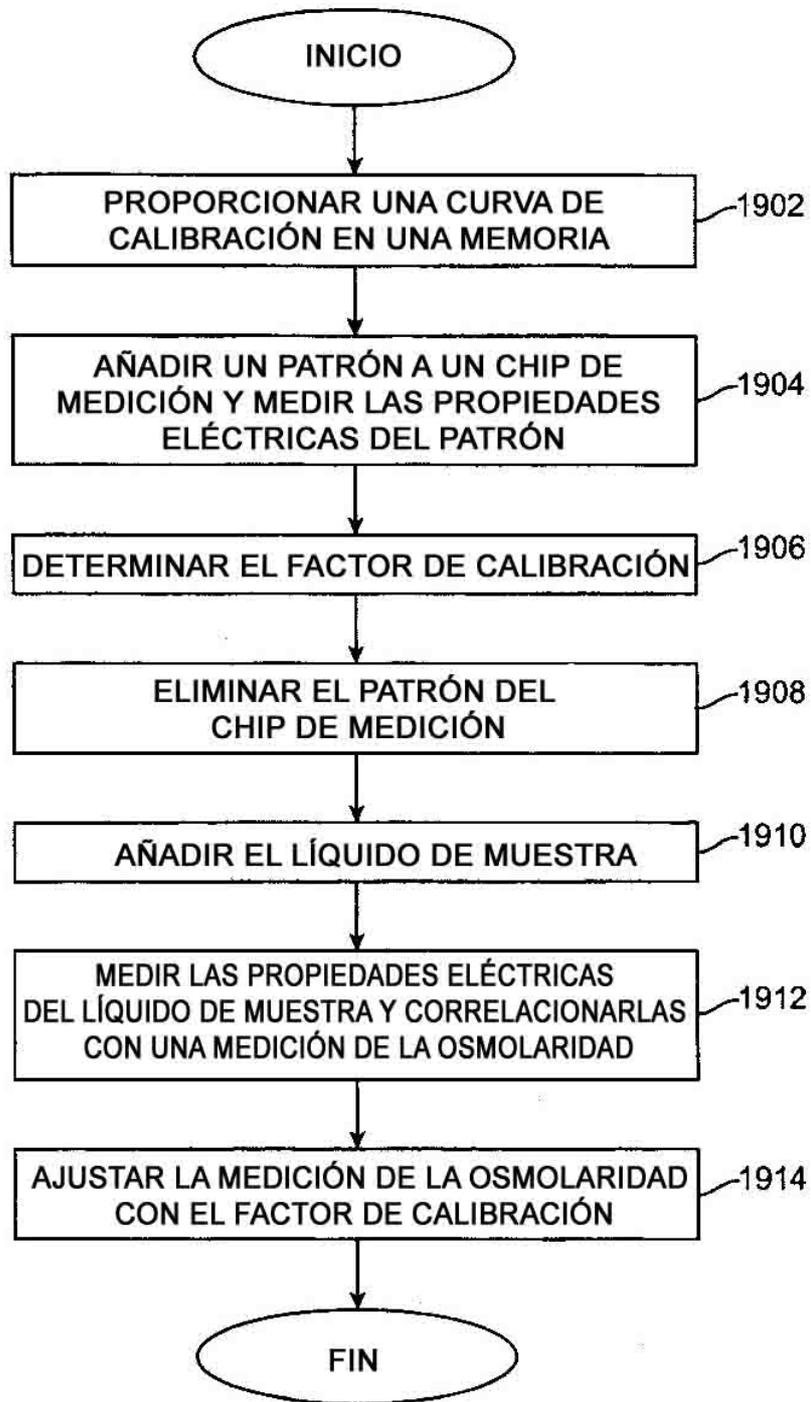


FIG. 19

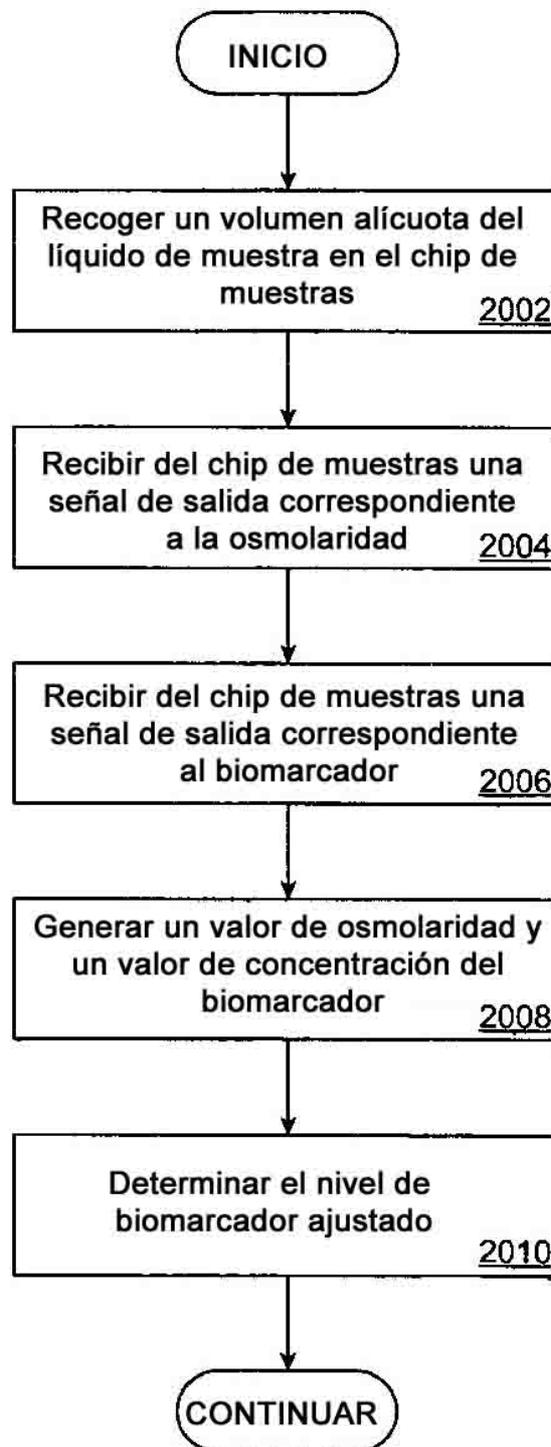


FIG. 20

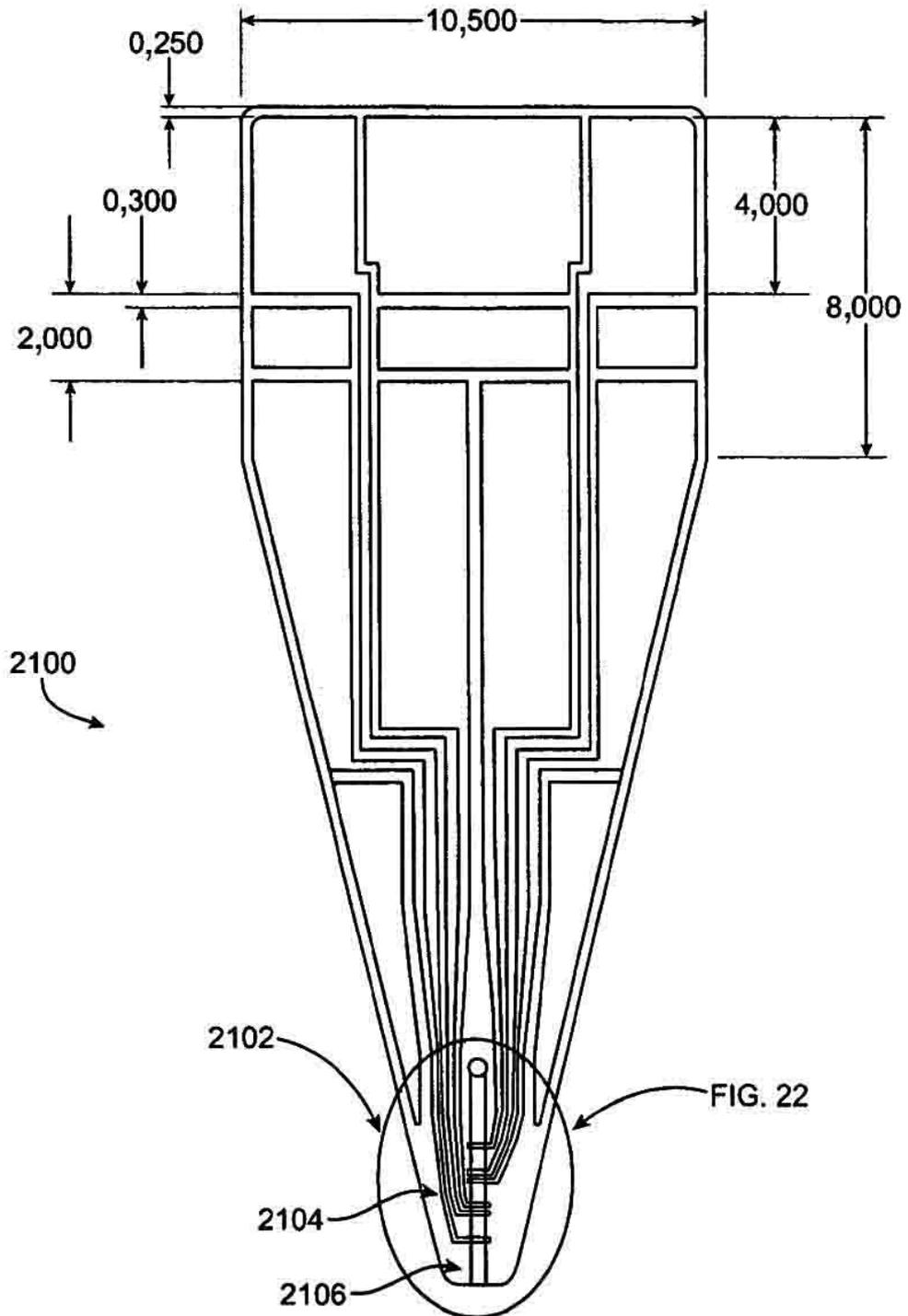


FIG. 21

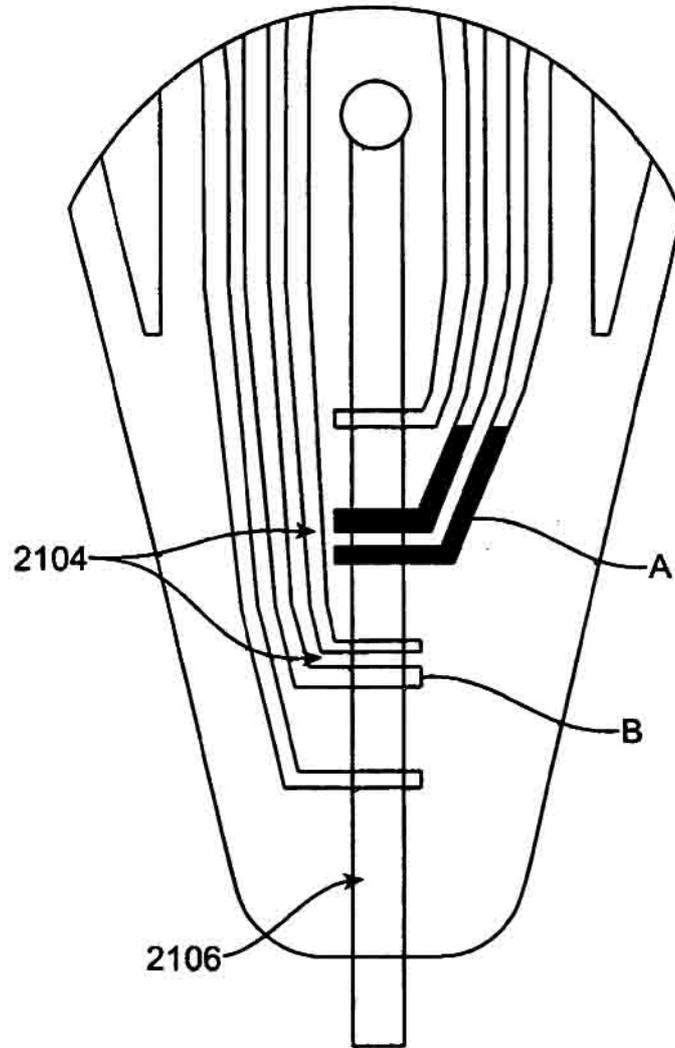


FIG. 22