

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 975**

51 Int. Cl.:

B01F 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014** E 14162100 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** EP 2783747

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la mezcla sin contacto de líquidos**

30 Prioridad:

27.03.2013 EP 13161448

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

07.08.2018

73 Titular/es:

**Nano Temper Technologies GmbH (100%)
(100.0%)
Flössergasse 4
81369 München, DE**

72 Inventor/es:

**BAASKE, PHILIPP y
DUHR, STEFAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 677 975 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

Procedimiento y dispositivo para la mezcla sin contacto de líquidos

- 5 La invención se refiere en general a un procedimiento y un dispositivo para la mezcla sin contacto de líquidos o para la mezcla de partículas en un líquido y, especialmente, para la mezcla de soluciones acuosas. Según la invención, mediante la irradiación selectiva de radiación electromagnética al líquido se genera un movimiento dirigido del líquido, por ejemplo para transportar partículas, preferentemente partículas disueltas en el líquido, a una superficie o una superficie límite de una cámara de muestra o a una superficie de un volumen de líquido, para realizar la mezcla
- 10 de las partículas con el líquido, especialmente en la superficie / superficie límite. La invención resulta ventajosa, porque se evitan una "capa de agotamiento" o una "capa enriquecida" con una concentración de partículas reducida o elevada en la superficie / superficie límite, de manera que se pueden mejorar procedimientos de medición basados en superficies o superficies límite.
- 15 La invención también resulta ventajosa, porque permite mezclar pequeños volúmenes (microvolúmenes) que resultan difíciles de mezclar mediante acciones mecánicas como la agitación o la sacudida.

En especial, la invención se refiere también a un procedimiento o a un dispositivo para examinar interacciones o acciones recíprocas específicas o inespecíficas de partículas, preferentemente disueltas en un líquido, con superficies o superficies límite.

20

Antecedentes de la invención

25 La medición de procesos físicos, químicos, bioquímicos y/o biológicos, tales como reacciones, procesos de ligado y de adición y otro tipo de acciones recíprocas de partículas con superficies son de gran interés en los ámbitos del control de calidad, la investigación de principios activos, la medicina, la investigación fundamental y el diagnóstico molecular. Para examinar estos procesos se usan métodos como la espectroscopia de interferencia reflectométrica (RfS), la interferometría de biocapa (BLI), la resonancia de plasmones superficiales ("Surface Plasmon Resonance", SPR), las microbalanzas de cristal de cuarzo ("Quartz Crystal Microbalance", QCM), la onda acústica superficial, abreviada por OAS (ingl. SAW por "surface acoustic wave"), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), o bien, nanoporos o transistores (secuenciación de próxima generación / "Next Generation Sequencing").

30

Otros ejemplos de métodos son las mediciones de fluorescencia, las mediciones de anisotropía de fluorescencia, las mediciones de transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET), la microscopia de fluorescencia de reflexión interna total (inglés, "total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM), las mediciones por interferometría retrodispersa (BSI), las mediciones de absorción, las mediciones espectroscópicas, los ensayos AlphaScreen®, las mediciones de termoforesis a microescala (MST), las mediciones de fijación de membranas ("Patch Clamp").

35

40 Preferentemente, las partículas que han de ser examinadas se ponen a disposición en un líquido, preferentemente una solución acuosa. Los procedimientos basados en superficies generalmente dependen de que las partículas que han de ser examinadas puedan alcanzar la superficie del líquido o la superficie de una cámara de muestra durante un período de tiempo prolongado, del tiempo de medición o del tiempo de incubación o de procedimiento. A causa de la concentración finita de las partículas en el líquido así como a causa de la constante de difusión limitada (velocidad de difusión) de las partículas, frecuentemente se forma una llamada "capa de agotamiento" (en inglés, "Depletionlayer", véase por ejemplo J. Mol. Recognit. 1999; 12:293-299) en la superficie o superficie límite. Esta capa de agotamiento puede conducir a una falsificación de los resultados de medición o a una ralentización de la reacción o del examen en la superficie. De manera correspondiente, en determinadas aplicaciones, por ejemplo en la medición de la tasa k_{off} (tasa de disociación), en la que se mide cómo y con qué rapidez partículas (p.ej. anticuerpos) anteriormente ligadas a la superficie se vuelven a soltar de esta y forman una "capa enriquecida" de las partículas que se sueltan. La capa enriquecida puede conducir a un llamado "re-binding" / retroligado / religado de las partículas que se sueltan. Por las siguientes causas, tanto la capa de agotamiento como la capa enriquecida pueden conducir a una falsificación de los resultados de medición:

45

50

55 a) Molesta el ligado (medición de la tasa de ligado / cinética de ligado), capa de agotamiento. En este caso, en la cámara de muestra se introduce una solución compuesta por una solución tampón y partículas A disueltas que han de ser examinadas, con la concentración [A]. La cinética de ligado se describe por la tasa $\gamma = k_{on} * [A] + k_{off}$, es decir, con la adición de la solución tampón con partículas A, la tasa de ligado (tasa de asociación) k_{on} no puede medirse independientemente de la tasa de disociación k_{off} . Se puede medir solo una tasa aparente γ que, sin embargo, depende de la concentración [A]. Pero frecuentemente, se desea determinar las tasas k_{on} y k_{off} independientes de la concentración. Por ello, también es necesario b).

60

65 En a), molesta la capa de agotamiento (ligado, asociación) en b) molesta la capa enriquecida (disociación).

b) Medición de la disociación / tasa de disociación k_{off} , molesta la capa enriquecida (véase por ejemplo también

“Blocking rebinding with soluble receptor” (bloqueo de religado con receptor soluble) en J. Mol. Recognit. 1999; 12:293-299).

5 Dado que, como se ha descrito en a), k_{on} y k_{off} , no se pueden medir independientemente, es preciso un segundo experimento con el que se pueda determinar k_{off} sola y después junto a a) o a una medición repetida de a) respectivamente con distintas concentraciones [A], que pueda determinar k_{on} :

10 En este caso, en la cámara de muestra se introduce solo la solución tampón, sin partículas A, en la que previamente se midió el ligado de A. En la cámara de muestra, A está ligado a la superficie, y se intenta “eliminarlo por lavado” o soltarlo con la solución tampón para poder medir la k_{off} pura de A. Es decir, si se añade una solución tampón pura a una cámara de muestra en la que A está ligado a la superficie (o a las moléculas B inmovilizadas allí), se debe ajustar un nuevo equilibrio químico (el equilibrio químico ajustado previamente se ha ajustado para una solución tampón que contiene A), esto conduce a que se suelten las moléculas A. Si la molécula A que se está soltando se evacúa con la rapidez suficiente, no se puede volver a ligar a la superficie (esto conduciría a que se vuelva a medir gamma, es decir k_{on} y k_{off} al mismo tiempo) y de esta manera se puede medir la tasa k_{off} pura. Si A no se evacúa con la rapidez suficiente, se forma una capa enriquecida. k_{on} y k_{off} habitualmente se indican en las unidades: k_{on} : $l/([s]*[M])$ o k_{off} : $l/[s]$.

20 En procedimientos conocidos se intenta reducir esta capa de agotamiento o capa enriquecida mediante una corriente constante de líquido que se genera por ejemplo mediante bombas externas. Esta solución tiene la gran desventaja de que por las bombas, válvulas y/o tubos flexibles exteriores resulta un gran volumen muerto y el conjunto del sistema es muy susceptible a errores. Además, las fugas, el ensuciamiento de los tubos flexibles y de las válvulas, la contaminación cruzada por muestras antiguas que no pudieron eliminarse en su totalidad son causas de errores de medición adicionales. Dado que, frecuentemente, los usuarios disponen solo de muy poco material de muestra o de material de muestra muy caro, los volúmenes muertos mencionados anteriormente son una gran desventaja económica. Además, generalmente, para el control y la regulación de las bombas y válvulas y por tanto de la corriente de líquido resultan ventajosos aparatos muy grandes / voluminosos, difíciles de transportar. Esto puede impedir entre otras cosas su uso en el diagnóstico “point of care” / “point of need”.

30 Otro procedimiento con el que se pretende evitar la capa de agotamiento mueve o “sacude” la cámara de muestra de forma macroscópica con respecto a un sensor de superficie. Sin embargo, un problema de este procedimiento consiste en que la cámara de muestra debe estar abierta hacia fuera, por lo que la solución acuosa puede evaporarse y/o ensuciarse por influjos externos. La “sacudida” mecánica de la cámara de muestra abiertas además resulta problemática, porque por la sacudida pueden desbordarse los líquidos y de esta manera entrar en cámaras de muestra contiguas abiertas.

Además, se remite a la memoria de patente DE10325307B3 en la que se describe un procedimiento para la mezcla de líquidos en una microcavidad aprovechando corrientes inducidas por sonido.

40 Los documentos US-A-5823676, EMIR VELA ET AL: “Non-contact meoscale manipulation using laser induced convection flows”, INTELLIGENT ROBOTS AND SYSTEMS, 2008. IROS 2008. IEEE/RSJ INTERNATIONAL CONFERENCE ON, IEEE, PISCATAWAY, NY, EE.UU., 22 de septiembre de 2008 (2008-09-22), páginas 913 a 918, y DUHRS S ET AL: “Thermophoresis of DNA determined by microfluidic fluorescence”, EUROPEAN PHYSICAL JOURNAL E. SOFT MATTER, EDP SCIENCAS, IT, tomo 15, N° 3, 1 de noviembre de 2004 (2004-11-01), páginas 277 a 286 describen la mezcla de líquidos mediante la generación de una corriente de convección térmica.

La presente invención tiene el objetivo de reducir o superar especialmente las desventajas del estado de la técnica mencionadas anteriormente y de proporcionar un nuevo procedimiento preferentemente más ventajoso así como un dispositivo y un sistema correspondientes.

50 RESUMEN DE LA INVENCION

El objetivo se consigue mediante las características de las reivindicaciones independientes. Otras formas de realización preferibles resultan de las reivindicaciones subordinadas y los siguientes aspectos o ejemplos de realización.

60 La invención se refiere en general a un procedimiento para la mezcla de fluidos, preferentemente líquidos o para la mezcla de partículas en un fluido o un líquido. Preferentemente, la invención se refiere a un procedimiento para la mezcla de partículas disueltas y/o no disueltas en el líquido. En general, la presente invención se refiere a la mezcla de cualquier tipo de partículas como por ejemplo (bio)moléculas, (nano)partículas, (micro)beads, (bio)polímeros, barnices, emulsionantes, células (células biológicas), virus, bacterias, lípidos, vesículas, liposomas, nanodiscos, pigmentos, aditivos dispersantes, pastas.

65 Preferentemente, el líquido se pone a disposición como volumen de líquido en al menos una cámara de muestra, pudiendo estar la cámara de muestra abierta o cerrada. Alternativamente a una cámara de muestra, el líquido también puede ponerse a disposición en forma de una gota, generándose según la invención una corriente de

convección térmica dentro de la gota. Por ejemplo, la gota de líquido puede ponerse a disposición sobre un porta-objeto adecuado (véase más adelante) y estar envuelta por ejemplo por una capa de aceite para evitar una evaporación. Según una forma de realización preferible basta incluso con la puesta a disposición de volúmenes de líquido muy pequeños en capilares de vidrio.

5 Independientemente de si el líquido con partículas presentes en este (en forma disuelta o no disuelta) se pone a disposición dentro de una cámara de muestra o dentro de una gota para una medición, una corriente de convección en el volumen de líquido se consigue mediante la irradiación de radiación electromagnética al volumen de líquido y especialmente mediante la mezcla del líquido con las partículas presentes en este en una superficie del volumen de líquido o en una superficie límite o capa límite entre el volumen de líquido y una capa de material de la cámara de muestra. El procedimiento según la invención así como el dispositivo correspondiente por tanto pueden aplicarse para procedimientos de medición en los que preferentemente se mide en la superficie o la superficie límite de un líquido, ya que según la invención se evitan una zona de agotamiento, una capa de agotamiento, una zona enriquecida, una capa enriquecida o un desplazamiento de concentración en la superficie o la superficie límite.

15 Según la invención, se pretende conseguir especialmente una buena mezcla en superficies de contacto entre el cuerpo sólido (p.ej., la superficie interior de una cámara de muestra o de capilares de vidrio) y el líquido. Una superficie o superficie de contacto según la invención, sin embargo, no se limita a una superficie plana, sino que también puede ser tridimensional o fractal, p.ej., si se usan sustratos de vidrio recubiertos con dextrano o dendrímero y se produce la interacción entre p.ej. un anticuerpo y un antígeno en / dentro de la capa de dextrano.

25 Preferentemente, la corriente de convección térmica se genera con la ayuda de al menos una fuente de radiación electromagnética, preferentemente una fuente de luz. Según la invención, la corriente de convección térmica se genera con la ayuda de una fuente de radiación infrarroja (IR). Por ejemplo, la radiación infrarroja puede generarse con fuentes de radiación IR y preferentemente puede posicionarse localmente y también enfocarse en el líquido mediante un medio óptico (por ejemplo, una lente y/o un espejo / reflector). En función de la estructura de experimento según la invención o de la aplicación también puede resultar ventajoso si el rayo IR se paraleliza o incluso se desenfoca (divergente). Según la invención, como fuente de radiación se usan LED IR.

30 Especialmente, el líquido preferentemente se calienta localmente en el lugar del rayo irradiado y de esta manera se genera la corriente de convección térmica. Dicho de otra manera, la presente invención genera corrientes de líquido preferentemente de forma directa y preferentemente de forma puramente óptica y especialmente totalmente sin contacto, directamente en el líquido / la solución con las partículas. Dado que, los líquidos que han de ser examinados frecuentemente son soluciones acuosas, en estos casos resulta especialmente ventajoso seleccionar la radiación electromagnética dentro de la gama de longitudes de onda infrarroja, por el comportamiento de absorción ventajoso.

40 Los inventores de la presente invención han encontrado además que una solución acuosa no absorbe solamente la energía de la radiación láser IR, sino que también el impulso de los fotones de la radiación láser IR (presión lumínica) influye en el comportamiento de convección (véanse las figuras 2A, 2B). Por la absorción de energía, la solución acuosa se calienta localmente en el lugar en el que la radiación láser infrarroja se irradia a la solución acuosa, lo que conduce a la convección térmica. Adicionalmente, durante la absorción, también el impulso de los fotones de la radiación láser IR se transmite a la solución acuosa. Mediante esta presión lumínica (o presión de radiación), la velocidad de circulación de la convección térmica puede incrementarse (de forma antiparalela a la gravitación) o atenuarse (de forma paralela a la gravitación), según la orientación de la radiación láser IR con respecto al vector de la gravitación. La radiación láser también puede orientarse perpendicularmente u oblicuamente a la gravitación.

50 La longitud de onda de la radiación infrarroja preferible se sitúa preferentemente en el intervalo de 1.200 nm a 2.000 nm. De forma más preferible, las longitudes de onda de láser IR especiales son: 980 nm (+/- 10 nm); 1.450 nm (+/- 20 nm); 1.480 nm (+/- 20 nm), 1.550 nm (+/- 20 nm) y 1.920 nm (+/- 20 nm).

55 La invención se refiere además a un dispositivo para realizar el procedimiento según la invención. Especialmente, el procedimiento según la invención se emplea preferentemente en combinación con procedimientos de medición / dispositivos de medición basados en superficies / superficies límite. De esta manera, se pueden examinar de manera segura y fiable por ejemplo interacciones químicas, bioquímicas específicas en superficies límite, preferentemente en volúmenes extremadamente pequeños. Además de interacciones específicas de partículas con superficies límite, pueden examinarse también efectos inespecíficos como por ejemplo la "adhesión", la fisiosorción, la quimisorción, la sorción, la adsorción, la absorción, procesos electroquímicos, procesos catalíticos etc.

60 Así, el procedimiento de mezcla según la invención se puede usar por ejemplo en la combinación con el dispositivo de medición para la determinación de propiedades ópticas en una capa delgada, por lo que se pueden demostrar por ejemplo reacciones químicas, bioquímicas, médicas y/o físicas, procesos de ligado y/o de adición así como otro tipo de acciones recíprocas en la capa delgada. En procedimientos de medición conocidos se irradia por ejemplo luz, preferentemente luz de una longitud de onda determinada, a una muestra que ha de ser examinada, estando ligada la muestra a una capa delgada. Los cambios en el grosor de capa óptica se detectan o se miden por ejemplo

mediante fenómenos de interferencia, lo que permite sacar conclusiones sobre reacciones de la muestra examinada con una capa delgada pretratada de manera correspondiente.

5 Otra ventaja del procedimiento según la invención consiste por ejemplo también en que no existe ningún volumen muerto. Según la invención, el consumo volumétrico de varios 100 microlitros a varios mililitros se puede reducir a entre varios nanolitros y varios microlitros. Preferentemente, como volúmenes según la invención se usan volúmenes de 1 microlitro a 10 microlitros. Preferentemente, se suprimen células de flujo, microfluidicas, bombas, válvulas y tubos flexibles complejos, por lo que un dispositivo según la invención es muy robusto y preferentemente no se puede ensuciar por posibles residuos en tubos flexible y/o válvulas y también evita la pérdida de la muestra /
10 de las partículas en la muestra por la adhesión (adsorción / quimisorción / fisorción) de las partículas a las superficies de los tubos flexibles y las válvulas (dicho de forma más general: a las superficies de los volúmenes muertos).

15 Dado que las corrientes de líquido preferentemente se generan totalmente sin contacto, de forma puramente óptica, se consigue reducir y, preferentemente, incluso excluir una contaminación cruzada y/o un ensuciamiento de las muestras. Según la invención, se pueden usar cámaras de muestra tanto abiertas como cerradas, pudiendo evitarse mediante cámaras de muestra cerradas además la vaporización / evaporación de la solución (acuosa). Esto resulta ventajoso por ejemplo porque de esta manera son posibles unos tiempos de medición notablemente más largos.

20 Generalmente, la convección es provocada por una corriente que puede transportar partículas. Causa de la corriente transportadora pueden ser básicamente diferentes fuerzas, como por ejemplo la fuerza de peso o fuerzas provocadas por diferencias de presión, de densidad, de temperatura o de concentración. Se distingue entre la convección forzada en la que el transporte de partículas es provocado por acción externa, por ejemplo un soplador o una bomba, y la convección libre o natural en la que el transporte de partículas es provocado preferentemente
25 exclusivamente por efectos de los gradientes de temperatura. El procedimiento según la invención produce preferentemente una convección libre o natural, es decir, la convección provocada por un gradiente de temperatura. En este caso, el aumento de temperatura preferentemente es tan reducido que las partículas o la muestra no quedan dañadas y/o afectadas negativamente.

30 Una convección libre a causa de diferencias de densidad térmica se puede describir por ejemplo de la siguiente manera: En caso de calentamiento, las sustancias generalmente se dilatan (excepción: p.ej., la anomalía de densidad del agua). Bajo la acción de la fuerza gravitacional, dentro de un líquido, las zonas de menor densidad ascienden hacia el campo gravitacional (empuje ascensional), mientras que las zonas de mayor densidad
35 descienden en el mismo. Por ejemplo, cuando en el lado inferior de una cámara de muestra se suministra calor y en el lado superior existe la posibilidad de un enfriamiento, resulta una corriente continua: El líquido se calienta, se dilata durante ello y asciende hacia arriba. Una vez llegado allí, el líquido se enfría se vuelve a contraer y desciende para volver a calentarse abajo.

40 La velocidad de las corrientes de líquido de la convección térmica según la invención puede modificarse o controlarse preferentemente mediante la variación de la energía o potencia óptica, el enfoque o el desenfoque, la intensidad, la dirección, el paralelismo (o la convergencia y divergencia) y/o la posición del foco con respecto a la superficie / capa delgada que ha de ser examinada, el número de rayos (el rayo láser se puede dividir para calentar varios lugares al mismo tiempo), la duración de irradiación, la modulación de anchos de impulso (intensidad de impulso, duración de impulso, frecuencia de repetición), la longitud de onda, la velocidad del rayo movido, la
45 radiación irradiada y/o en función de la dirección de irradiación con respecto a la gravitación. La posición de la radiación irradiada (p.ej., la posición del foco de la radiación irradiada) puede variar, por ejemplo, el foco puede posicionarse mediante sistemas de espejos (véase, escáner láser) en las tres direcciones en el espacio y con diferentes velocidades. Dado que la presente invención puede generar, por medio de convección térmica generada ópticamente, también corrientes de líquido perpendiculares a las superficies de cámaras de muestra (al contrario de corrientes de líquido generadas por bombas externas), la mezcla del líquido y la reducción de una capa de agotamiento son muy eficientes.

50 La velocidad de la convección térmica depende entre otras cosas del grosor de la cámara (altura en la dirección de la gravitación) de la cámara de muestra y especialmente de la geometría de la cámara. Especialmente, las superficies marginales de una cámara de muestra pueden influir significativamente en la velocidad de la convección térmica. Resultan preferibles las cámaras de muestra suficientemente gruesas (por ejemplo > 0,05 mm) para alcanzar una velocidad de circulación rápida deseada de la convección térmica, para evitar la "depletionlayer" (capa de agotamiento) o una capa enriquecida.

60 Resulta especialmente preferible conseguir según la invención una convección térmica de tal forma que se genere preferentemente una corriente laminar, preferentemente con pequeños números de Reynold s (número de Reynolds $Re < 1.000$). Preferentemente, se emplean cámaras de muestra (también gotas de líquido o gotas de agua) con un volumen $\leq 200 \mu l$ (microcavidad). Además, resulta preferible un espesor de capa de al menos 0,05 mm, ya que con menores espesores de capa o menores grosores de la cámara de muestra, el efecto de convección es demasiado débil como para conseguir una mezcla deseada. También resulta preferible usar espesores de capa del líquido o
65 grosores de la cámara de muestra no superiores a 11,5 mm (profundidad de ondulación en placas multionduladas).

Un ejemplo de velocidad de convección en una cámara de muestra como cristal con una altura de 1 mm y un diámetro de 5 mm, un volumen de 20 μl , una temperatura de cámara de 52°, un láser IR con 1.480 nm con una potencia luminosa irradiada de 75 mW, asciende a una velocidad media de aprox. 04 mm/s. Una dilatación típica o media de las líneas de corrientes de convección se sitúa en este ejemplo en un diámetro de aprox. 2 mm.

En la siguiente geometría de cámara de muestra: cristal con una altura de 0,05 mm y un diámetro de 5 mm; temperatura de cámara: 20 °C, láser IR: 1.480 nm; aumento de temperatura por radiación láser IR: 1,25 K; la velocidad típica / media de la convección es de aprox. 0,0005 mm/s, si la radiación láser IR está orientada de forma antiparalela a la gravitación, es decir, que fomenta la convección térmica.

A continuación, se describe una comparación de la velocidad de convección con la velocidad de difusión de las partículas. Esta comparación muestra por ejemplo que la difusión finita, y por tanto demasiado lenta, puede conducir al problema de la capa de agotamiento o capa enriquecida. Ejemplos de constantes de difusión D de biomoléculas se sitúan entre 1 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ y 400 $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

Preferentemente, el movimiento / el desplazamiento / la mezcla de las partículas a causa de la corriente de convección se produce de forma adaptada al movimiento de las partículas (movimiento de Brown) a causa de su difusión (constante de difusión D). Según la constante de difusión de las partículas que han de ser examinadas hay una velocidad de circulación media de uso preferente de la convección térmica y por tanto por ejemplo también intensidades de radiación o configuraciones de uso preferente para la irradiación de la radiación. A causa de la estructura muy flexible y bien variable y preferentemente puramente óptica según la invención, la corriente de convección y por tanto la mezcla pueden ajustar preferentemente a las partículas que han de ser examinadas, sin necesidad de construir una nueva estructura especial para cada partícula.

El procedimiento según la invención para la mezcla de líquidos puede aplicarse de manera especialmente ventajosa en la analítica, especialmente en procedimientos analíticos en los que pueden ser de importancia la cinética de ligado de biomoléculas (por ejemplo, las constantes de asociación y de disociación; k_{on} , k_{off} , llamadas también tasas para la reacción de ida (k_{on}) y la reacción de vuelta (k_{off})) y la afinidad de ligado descrita por ejemplo por la constante de disociación $K_d = k_{off}/k_{on}$. Estas constantes de tasa pueden describirse a título de ejemplo de la siguiente manera. Se supone una reacción química de la molécula A con la concentración [A] con la molécula B con la concentración / densidad de superficie [B] formando el complejo D con la concentración [D]. La cinética de esta reacción, es decir, la cinética de la formación de complejo puede describirse con la siguiente ecuación que por tanto representa también la importancia de las constantes de tasa:

$$\frac{d}{dt} [D(t)] = k_{on} * [A(t)] * [B(t)] - k_{off} * [D(t)]$$

Otros ejemplos de la aplicación de la mezcla según la invención es el “diagnóstico” (la mezcla es importante también en ELISA), el ámbito de la electroquímica, el ámbito de los catalizadores, o el ámbito del control de calidad (detectar la “adhesión” a superficies para evitarla). Además, se pueden medir tasas de la “adhesión” de partículas o la medición de la intensidad de la “adhesión” (la “adhesión”, la fisiosorción, la quimisorción, la adsorción, la absorción).

También en placas multionduladas (lugar de uso: ELISA) resulta ventajosa la mezcla por medio de convección térmica generada ópticamente. Con placas de 384 ondulaciones y/o placas de 1.536 ondulaciones, las fuerzas de adhesión del líquido a las superficies de las ondulaciones (microcavidades) son tan grandes que el líquido en las ondulaciones ya no se mezcla correctamente sobre un agitador / sacudidor. La mezcla por medio de convección térmica generada ópticamente también puede ser ventajosa en placas de 96 ondulaciones u otros recipientes de reacción, por ejemplo cuando por razones como por ejemplo evitar contaminaciones no pueden usarse agitadores mecánicos u otros dispositivos de mezcla como por ejemplo agitadores magnéticos. Por medio de láser IR que se emplea por ejemplo también solo durante respectivamente algunos segundos en cada ondulación, se consigue una mejor mezcla dentro de la ondulación (volumen < 200 μl). Según la invención, especialmente en esta aplicación, la convección térmica para la mezcla también ha de generarse por medio de LED IR. Los LED IR son económicos; se pueden emplear por ejemplo 384 LED o 96, o 24 o 16, para mezclar muchas ondulaciones al mismo tiempo. Los LED IR tienen típicamente menos potencia luminosa que los láseres IR, pero como el espesor de capa de la solución acuosa en las ondulaciones es muy grande (típicamente > 1 mm), la radiación IR es absorbida muy bien (ley de Beer-Lambert) y, por tanto, también los LED IR tienen la potencia luminosa suficiente.

En general, el procedimiento según la invención resulta ventajoso para mediciones de cinética de reacción o para la analítica de biomoléculas. Especialmente, el procedimiento puede usarse con capilares NanoTemper® (por ejemplo capilares de vidrio con un diámetro interior de 0,05 mm a 0,8 mm), preferentemente con diámetros interiores de 0,2 mm, 0,35 mm, 0,5 mm y 0,8 mm y diámetros exteriores iguales o inferiores a 1,0 mm. Preferentemente, no se requieren células de flujo y el llenado de los capilares puede realizarse de forma puramente pasiva mediante fuerzas capilares. La superficie interior de los capilares de vidrio puede estar sin tratar o estar al menos en parte recubierta / modificada específicamente (por ejemplo, con anticuerpos, antígenos, DNA, RNA, APN, ATN, proteínas, péptidos, células, polímeros etc.) o no.

El procedimiento descrito puede realizarse en general con cámaras de muestra o porta-objetos que presenten al menos una zona transparente. En física, la transparencia es la capacidad de una materia de dejar pasar (transmisión) ondas electromagnéticas. En la vida cotidiana, el término generalmente se refiere a luz, es decir al intervalo espectral de radiación electromagnética que es visible para el ser humano. Según la invención, el material transparente preferentemente es permeable en una gama de longitudes de onda entre 200 nm y 2.000 nm, es decir, preferentemente también para luz infrarroja y/o luz UV. Preferentemente, el material transparente es transparente para luz en la gama de 200 nm a 900 nm, preferentemente de 250 nm a 900 nm, preferentemente 275 nm a 850 nm. Preferentemente, el material transparente es transparente también para luz de la siguiente longitud de onda: 940 nm a 1.040 nm (preferentemente 980 nm +/- 10 nm), 1.150 nm a 1.210 nm, 1.380 nm a 1.600 nm (preferentemente 1.450 nm +/- 10 nm y/o 1.480 nm +/- 10 nm y/o 1.550 nm +/- nm), 1.900 a 2.000 nm (preferentemente 1.930 nm +/- 10 nm).

Además, puede ser suficiente si el material transparente deja pasar tan solo 10% de la luz irradiada, preferentemente al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o al menos 90% o más.

El material transparente puede presentar por ejemplo vidrio y/o un polímero. Posibles materiales son también los borosilicatos o el vidrio de borosilicato como el vidrio de borosilicato 3.3 (por ejemplo vidrio DURAN), vidrio de cuarzo, como el Suprasil, el Infrasil, el vidrio de cuarzo sintético o el vidrio de sílice, el vidrio a base de sodio y cal, Bk7, vidrio ASTM tipo 1 clase A, vidrio ASTM tipo 1 clase B. El polímero puede presentar PTFE, PMMA, Zeonor™, Zeonex™, teflón, AF, PC, PE, PET, PP (polipropileno), PPS, PVDF, PFA, FEP, y/o vidrio acrílico].

El procedimiento descrito también puede emplearse con puntas de pipeta, especialmente con puntas de pipeta al menos parcialmente transparentes, por ejemplo, de polipropileno. El procedimiento según la invención también se puede emplear con recipientes de reacción, por ejemplo, recipientes de reacción de vidrio o de materia sintética ("Eppis"), preferentemente de vidrio y materia sintética transparentes. Por ejemplo, con recipientes de reacción para la "Realtime PCR (reacción de cadena de polimerasa)" El procedimiento según la invención también se puede emplear con cámaras / capilares para la electroforesis, preferentemente la electroforesis capilar. El procedimiento según la invención también se puede emplear en la zona de detección de una HPLC/UHPLC (cromatografía de líquidos de alta eficacia (en inglés, performance liquid chromatography, HPLC)). El procedimiento descrito también puede emplearse con cámaras microfluídicas / chips microfluídicos). El procedimiento según la invención puede emplearse con placas de análisis volumétrico múltiple cerradas / selladas (placas de análisis volumétrico múltiple) que tienen un fondo y/o una tapa transparentes. El procedimiento descrito puede emplearse en ampollas soldadas / selladas, por ejemplo ampollas de vidrio o ampollas de materia sintética, preferentemente ampollas transparentes. En las ampollas pueden estar encerradas por ejemplo sustancias para ensayos forenses o diagnósticos, que no deben impurificarse y por tanto preferentemente no deben abrirse.

El procedimiento según la invención también puede realizarse con placas de análisis volumétrico múltiple (placas multionduladas) que tienen un fondo no transparente. Preferentemente, sin embargo, las placas de análisis volumétrico múltiple (placas multionduladas) para el llenado con pipetas o robots de pipeteado están abiertas, preferentemente abiertas por arriba.

El procedimiento según la invención puede emplearse por ejemplo también en todos los casos en los que una mezcla / una generación de corriente por medio de un flujo externo (bombas) y/o de sacudida mecánica no es posible (por ejemplo, todos los recipientes de reacción / microcavidades cerrados) o no conviene, pero la solución acuosa está accesible ópticamente.

El procedimiento según la invención puede aplicarse en el diagnóstico, también para la mezcla en placas ELISA. Otro ejemplo de campo de aplicación es el control de calidad.

El procedimiento según la invención para la mezcla puede combinarse con una multiplicidad de diferentes técnicas de medición y de lectura conocidas, especialmente para la medición de interacciones específicas e inespecíficas de partículas en superficies / superficies límite. Se mencionarán como ejemplos las siguientes técnicas superficiales típicas: Para la medición se emplean métodos como la espectroscopia de interferencia reflectométrica (RIfS), la interferometría de biocapa (BLI), la resonancia de plasmones superficiales (en inglés, "Surface Plasmon Resonance", SPR), las microbalanzas de cristal de cuarzo (en inglés, "Quartz Crystal Microbalance", QCM), la onda acústica superficial, abreviada por OAS (en ingl., SAW por "surface acoustic wave"), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), o bien, nanoporos o transistores (secuenciación de próxima generación / "Next Generation Sequencing"). Por ejemplo, estos procedimientos de medición pueden mejorarse mediante una combinación de p.ej. capilares de vidrio con un diámetro determinado como cámara de muestra de la solución acuosa con las partículas, láseres IR / LED para generar una convección térmica en la solución acuosa en los capilares de vidrio y una disposición de medición o de experimentación correspondiente.

En general, el procedimiento descrito para la mezcla de líquidos o partículas con un líquido se refiere a los pasos: la puesta a disposición de un volumen de líquido y la generación de una convección térmica en al menos una superficie / superficie límite del volumen de líquido mediante la irradiación de radiación electromagnética al volumen de líquido.

- El volumen de líquido se puede poner a disposición por ejemplo en una cámara de muestra abierta o cerrada. Preferentemente, de cámara de muestra puede servir una microcavidad, más preferentemente un capilar o una punta de pipeta. Preferentemente, una cámara de muestra debería presentar al menos una zona al menos parcialmente transparente. Preferentemente, la cámara de muestra tiene un grosor de 0,01 mm a 25 mm, preferentemente de 0,05 mm a 12 mm, preferentemente de 0,05 mm a 1 mm. Según una forma de realización preferible, los capilares tienen un diámetro interior de 0,01 mm a 3 mm, preferentemente de 0,05 mm a 0,8 mm, estando hechos los capilares preferentemente al menos en parte de vidrio o de otro tipo de materiales al menos parcialmente transparentes. El volumen de líquido también puede ponerse a disposición como gota sobre un porta-objeto.
- Preferentemente, la cámara de muestra tiene un volumen de 0,001 μl a 1.000 μl , preferentemente de 0,1 μl a 200 μl , preferentemente de 1 μl a 10 μl , preferentemente de 1 μl a 6 μl .
- La superficie del volumen de líquido preferentemente está formada por la capa límite entre el volumen de líquido y una superficie de la cámara de muestra o, por ejemplo, por la capa límite entre el volumen de líquido y una superficie del porta-objeto.
- El líquido empleado es preferentemente una solución acuosa, pero no está limitado a esta.
- La radiación electromagnética presenta preferentemente una radiación infrarroja o solamente longitudes de onda en la gama IR y es generada preferentemente por un láser y/o un LED.
- La radiación irradiada puede estar dirigida de forma paralela y/o antiparalela a la gravitación y/o contener una componente orientada perpendicularmente a la gravitación.
- Preferentemente, la radiación irradiada genera un gradiente de temperatura de 0,001 $\text{k}/\mu\text{m}$ (=1 K/mm) a 5 $\text{k}/\mu\text{m}$ (=5.000 K/mm), preferentemente de 0,001 $\text{k}/\mu\text{m}$ (= 1 K/mm) a 2 $\text{k}/\mu\text{m}$ (=2.000 K/mm).
- Más preferentemente, el gradiente de temperatura se genera en un intervalo pequeño, preferentemente en un intervalo de 0,00001 mm^2 a 1 cm^2 , preferentemente en un intervalo de 0,0001 mm^2 a 12 mm^2 .
- Una zona de detección para la medición de características del líquido o de las partículas en el líquido puede estar situada a una distancia de la zona en la que se irradia la radiación. Por ejemplo, la zona de detección puede estar situada a una distancia de al menos 0,01 mm del rayo irradiado, midiéndose la distancia preferentemente perpendicularmente con respecto a la dirección de irradiación.
- Según otra forma de realización, la zona de detección y la zona de irradiación también se pueden solapar. Así, la superficie de detección frecuentemente es más grande que un rayo láser bien enfocado (con IR se pueden alcanzar por ejemplo diámetros de 2 μm). Por lo tanto, en esta forma de realización, preferentemente la corriente de convección pasa sobre la superficie de detección completa. El solape de la zona de detección y la zona de irradiación se puede aplicar por ejemplo en las estructuras de la figura 5 o la figura 6. Dado que todo se enfoca por la misma óptica, el foco calentador de la radiación IR se sitúa preferentemente dentro de la zona de detección.
- Las velocidades de circulación preferibles de la corriente de convección se sitúan preferentemente en el intervalo de 0,0001 mm/s a 10 mm/s, preferentemente de 0,000 mm/s a 2 mm/s.
- El procedimiento según la invención para la mezcla resulta especialmente ventajoso si se combina con procedimientos de medición adicionales. Especialmente, la presente invención se refiere también a un procedimiento para examinar acciones recíprocas moleculares en y/o dentro de una capa delgada en un volumen de líquido según la reivindicación 7.
- Preferentemente, se pone a disposición una cámara de muestra para la realización de una medición de este tipo en forma de un capilar, una punta de pipeta, una placa multiondulada o un chip microfluídico.
- La medición de la acción recíproca se realiza preferentemente mediante espectroscopia de interferencia reflectométrica (RIFS), resonancia de plasmones superficiales (en inglés, "Surface Plasmon Resonance", SPR), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), microbalanzas de cristal de cuarzo ("Quartz Crystal Microbalance", QCM) y/u onda acústica superficial, ("surface acoustic wave" SAW). Según otras formas de realización preferibles, la medición de la acción recíproca puede ser al menos un procedimiento del grupo: espectroscopia de interferencia reflectométrica (RIFS), interferometría de biocapa (BLI), resonancia de plasmones superficiales ("Surface Plasmon Resonance", SPR), microbalanzas de cristal de cuarzo ("Quartz Crystal Microbalance", QCM), onda acústica superficial, abreviada por OAS ("surface acoustic wave"; SAW), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), nanoporos o transistores (secuenciación de próxima generación / "Next Generation Sequencing").
- La presente invención se refiere también a un dispositivo para la mezcla de líquidos o partículas con un líquido,

especialmente para la realización de un procedimiento descrito anteriormente, según la reivindicación 9.

Finalmente, se da a conocer un sistema con un dispositivo para la mezcla y con un dispositivo para la mezcla, sirviendo el dispositivo de medición preferentemente para la medición de una acción recíproca específica o inespecífica de las partículas con una superficie / superficie límite de una cámara de muestra o de un porta-objeto.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describen en detalle formas de realización preferibles haciendo referencia a las figuras. Muestran:

- 10 la figura 1 un ejemplo de espectro de absorción IR de agua o de una solución acuosa con máximos de absorción representados,
- las figuras 2A y 2B esquemáticamente, la influencia de la orientación de un rayo láser IR irradiado, con respecto a la gravitación sobre las convecciones térmicas generadas;
- 15 la figura 3 una representación esquemática de la zona de detección preferible para mediciones de la acción recíproca específica e inespecífica de partículas dentro de una cámara de muestra;
- la figura 4 otra forma de realización de una disposición para el procedimiento descrito en la que está representado esquemáticamente especialmente el curso de rayos de rayos de luz implicados;
- 20 la figura 5 una representación esquemática de una disposición experimental para la medición de acciones recíprocas específicas o inespecíficas de partículas con una superficie;
- la figura 6 una representación esquemática similar a la figura 5, pero con un equipo dispuesto más arriba para el acoplamiento de un rayo láser para generar la convección en la célula de medición;
- 25 las figuras 7A y 7B muestran representaciones esquemáticas de la irradiación de radiación infrarroja a placas multionduladas; y
- la figura 8 muestra una representación esquemática de un ejemplo de una disposición experimental según la invención para la medición de fluorescencia multicolor (multiplexado) en una placa multiondulada en la que tanto la excitación de fluorescencia, la detección de fluorescencia así como el enfoque de la radiación IR se realizan por el mismo sistema óptico.
- 30

Descripción detallada de formas de realización preferibles

35 La **figura 3** muestra a modo de ejemplo la zona de detección 80 para mediciones de la acción recíproca específica e inespecífica de partículas. En la cámara de muestra 45 representada se trata a título de ejemplo de un capilar.

La zona de detección 80 se encuentra preferentemente en la superficie / superficie límite del volumen de medición dentro del capilar 45, es decir, en el lado interior de la cámara de muestra 45. La zona de detección 80 puede elegirse por ejemplo alrededor de la zona de una radiación infrarroja 30 irradiada, de tal forma que sea más pequeña, más grande o igual de grande que la superficie sobre la que pasa la convección térmica 90.

40

La zona de detección 80 puede ser por ejemplo una capa delgada y contener por ejemplo anticuerpos para la comprobación específica de antígenos. Dicho de otra manera, la zona de detección se encuentra en la superficie del líquido o en la superficie del capilar 45. La zona de detección 80 puede componerse por ejemplo también de varias capas delgadas diferentes que se diferencian por ejemplo por su índice de refracción, su polarizabilidad o su fluorescencia. La convección preferentemente se ajusta de tal forma que en la zona de detección no se produzca una formación de una capa de agotamiento o de una capa enriquecida. Por ejemplo, la convección térmica se puede ajustar de tal forma que transporte partículas desde muy fuera de la zona de detección, por ejemplo desde una distancia de varios milímetros, a la zona de detección.

45

50

El orden se puede variar, lo decisivo es que haya una distancia determinada entre el foco de láser IR (determina los "cilindros de convección") y el lugar en el que se detecta la acción recíproca en la superficie. La distancia entre ambos es importante, porque según la potencia y el grosor de cámara y la geometría de cámara, el láser IR genera corrientes de convección distintas. El conjunto debe ajustarse de tal forma que en el lugar de observación para la acción recíproca existan las corrientes de convección térmicas correctas (para evitar la capa de agotamiento de las moléculas).

55

La **figura 4** muestra un ejemplo de una disposición en la que se aplica el procedimiento según la invención. Aquí, la radiación láser 30 infrarroja se irradia desde abajo a una cámara de muestra 45 con un volumen de líquido, aquí una solución acuosa con partículas 50, y genera en la cámara de muestra 45 una convección térmica 90. Las velocidades de circulación en el líquido están representadas mediante vectores correspondientes. Además, en este ejemplo se puede apreciar una convección simétrica alrededor del rayo láser 30 irradiado. Como método de detección para la medición de la acción recíproca de las partículas 105 disueltas en el líquido con una capa delgada (representada en sombreado) de moléculas / partículas 103 inmovilizadas funcionalmente se usa el método de espectroscopia de interferencia reflectométrica (RIFS).

60

65

Resumiendo, RfS es un método físico que está basado en la interferencia de luz blanca en capas delgadas. En la práctica, este método se emplea por ejemplo para examinar acciones recíprocas moleculares. El principio de medición básico corresponde al interferómetro de Fabry-Pérot. RfS se aplica sobre todo como método de detección en sensores químicos y biológicos. Como capas sensitivas se usan generalmente polímeros de medición selectiva que clasifican las materias analizadas o bien por su tamaño (llamado efecto de cribado molecular en polímeros microporosos) o por diferentes polaridades (p.ej., polidimetilsiloxanos funcionalizados). En el ámbito de los sensores biológicos se aplican por ejemplo polímeros, tales como polietilenglicoles o dextranos, sobre el sistema de capas y sobre ello se inmovilizan estructuras de detección para biomoléculas. Como estructuras de detección puede usarse en principio cualquier clase de materia (proteínas como p.ej. anticuerpos, ADN / ARN como p.ej. aptámeros, pequeñas moléculas orgánicas como p.ej. estrona, pero también lípidos como p.ej. membranas de fosfolípidos).

En la figura 4 está representado además un soporte 46 que puede ser parte integrante de la cámara de muestra 45. Sin embargo, también es posible que la muestra que ha de ser examinada se ponga a disposición como gota o capa de líquido sobre el soporte. El soporte 46 puede estar hecho por ejemplo de vidrio o materia sintética. Sobre dicho soporte 46 está representada la capa delgada que ha de ser examinada que comprende una capa 103 de moléculas inmovilizadas funcionalmente y otra capa 102 de moléculas que está dispuesta entre la capa 103 y el soporte 46. La capa 102 sirve especialmente para una mejor adherencia de la capa delgada sobre el soporte 46. La capa 102 de moléculas (p.ej. PEG o dextrano, etc.) que está dispuesta entre la capa 103 y el soporte 46 (representado esquemáticamente) puede servir por ejemplo de distanciador y/o de ayuda de inmovilización para las moléculas funcionales de la capa 103. La capa 102 sirve especialmente también para una mejor adherencia de la capa 103 delgada sobre el soporte.

A las moléculas / partículas inmovilizadas funcionalmente de la capa 103 pueden ligarse partículas de muestra 105. A continuación, aumenta el espesor de la capa delgada y aumenta la distancia de su superficie límite 104 superior hacia el límite de fase entre la capa delgada y el soporte (o hacia la superficie límite inferior de la capa delgada). La luz 31 irradiada desde abajo que sirve para la medición es reflejada ahora también en la superficie límite 104 después del ligado de las partículas de muestra 105. La superficie límite 104 se origina con respecto a la solución con partículas 50 por ejemplo si las partículas de la solución acuosa se ligan a las moléculas inmovilizadas funcionalmente en la capa 103 delgada. El rayo 113 reflejado en esta superficie límite 104 está representado esquemáticamente. Además, están representados también los rayos reflejados 112, 111a, 111b y 110 que se reflejan en superficies límite situadas debajo de la superficie límite 104. Dado que la luz irradiada tiene que recorrer una mayor longitud de recorrido hasta la superficie límite 104, resulta un desplazamiento del interferograma generado por la superposición de la radiación electromagnética reflejada 110, 111a, 111b, 112 y 113. Este desplazamiento puede medirse con resolución de tiempo, lo que permite conclusiones sobre el cambio de espesor de capa y, por tanto, sobre la acción recíproca de las partículas 105 disueltas con las partículas 103 inmovilizadas funcionalmente.

Por ejemplo, las partículas 105 en la solución acuosa son biomoléculas tales como ADN, ARN, proteínas, anticuerpos, antígenos, etc., pequeñas moléculas, nanopartículas, polímeros, péptidos, APN, etc, o células, virus, bacterias, vesículas, liposomas, microbeads, nanobeads, nanodiscos, etc.

La **figura 5** muestra a título de ejemplo la aplicación del procedimiento en una disposición experimental concreta, pero sin limitarse a esta. La cifra de referencia 1 se refiere a una fuente de luz que se usa para la medición. Por ejemplo, en la fuente de luz 1 puede tratarse de uno o varios LED(s), uno o varios láseres y/o uno o varios SLED(s) (LED superluminescente). La luz de la fuente de luz 1 sirve en primer lugar para irradiar, preferentemente perpendicularmente, una muestra 50 que ha de ser examinada. La luz irradiada por la fuente de luz 1 puede modificarse mediante medios ópticos conocidos, por ejemplo por medio de un difusor 4 y/o un sistema de lente (no representado). Por ejemplo, un difusor 4 puede usarse para distribuir la luz uniformemente y usar un sistema de lente para concentrar la luz de manera deseada. A continuación, en esta forma de realización, la luz pasa por un polarizador 5, por ejemplo para la generación de luz polarizada linealmente. Adicionalmente, la luz puede atravesar también un filtro 14, de tal forma que un rayo de luz 31 se proyecta con características definidas sobre la muestra 50. El filtro 14 puede ser por ejemplo un filtro de longitud de onda, por ejemplo un filtro paso banda, o un filtro de paso largo o un filtro de paso corto.

En la forma de realización representada, el divisor de rayo 7 sirve para dividir el rayo de luz en un rayo de medición o una trayectoria de rayo de medición 9 y un rayo de referencia o una trayectoria de rayo de referencia 11, estando representada la trayectoria de rayo de medición hacia abajo y estando representada la trayectoria de rayo de referencia 11 hacia la izquierda hacia la disposición de detector de referencia 19'. El divisor de rayo 7 tiene preferentemente una característica polarizadora. En formas de realización determinadas, sin embargo, el divisor de rayo 7 también se puede omitir. Entonces, se suprime también la trayectoria de rayo referencia 11 o la rama de referencia completa formada por la trayectoria de rayo de referencia 11, el sistema de lente de referencia 17', el filtro de detector de referencia 23' y el detector de referencia 19'.

En la forma de realización representada con la rama de referencia, la disposición de detector de referencia 19' puede ser por ejemplo un fotodiodo, un fotomultiplicador (multiplicador de fotoelectrones, abreviado por fotomultiplicador, en inglés, tubo fotomultiplicador, PMT), una cámara CCD (Charge-Coupled Device), un CMOS

(“Complementary Metal Oxide Semiconductor”; semiconductor de óxido metálico complementario), un haz de diodos o un fotodiodo de avalancha. La rama de referencia puede presentar delante de la disposición de detector de referencia 19' un sistema de lente de referencia 17' para la reproducción / el enfoque a la disposición de detector de referencia 19' y/o un filtro de detector de referencia 23', por ejemplo un filtro paso banda, o un filtro de paso largo o un filtro de paso corto.

Antes de incidir sobre la muestra 50, la trayectoria de rayo 9 puede modificarse con medios ópticos adicionales dispuestos después del divisor de rayos 7. Están representados a título de ejemplo un filtro puntual 21 así como un (primer) elemento de corrección 35 óptico, para compensar / corregir por ejemplo el desplazamiento de fase, el cambio de polarización y/o el cambio de trayectoria de rayo generado posiblemente por el segundo divisor de rayo 34 para el acoplamiento de la radiación láser infrarroja. Además, está representado también un segundo elemento de corrección 36 óptico que puede ampliarse opcionalmente con una lente o una lente / un sistema de lente, por ejemplo para compensar / corregir el desplazamiento de fase, el cambio de polarización y/o el cambio de trayectoria de rayo que pueden ser producidos por el (segundo) divisor de rayo 34 para el acoplamiento de la radiación láser infrarroja. El segundo elemento de corrección 36 y/o la lente opcional o el sistema de lente opcional también pueden servir para enfocar las trayectorias de rayo a la muestra 50.

La muestra 50 se puede poner a disposición sobre un soporte 46 como gota o en una cámara de muestra 45, como está representado en las figuras 2 a 4. Especialmente, una cámara de muestra puede ser un capilar, una microcavidad, un recipiente de reacción (“Eppi”), una microfluídica, o una punta de pipeta, sin estar limitada a ello. La muestra 50 que ha de ser examinada es preferentemente un líquido, preferentemente una solución acuosa, con partículas 105 presentes en esta (véase la figura 4), que pueden estar presentes en forma disuelta o no disuelta.

El soporte 46 preferentemente es al menos en parte transparente, siendo el soporte 46 representado un vidrio porta-objeto, formado a partir de un vidrio, sobre el que está realizada una capa 103 delgada. La capa 103 delgada que ha de ser examinada comprende por ejemplo una capa de moléculas inmovilizadas funcionalmente.

La capa 103 delgada es influenciada por la muestra 50 que ha de ser examinada. Por ejemplo, una acción recíproca de las moléculas sobre la capa 103 delgada con las partículas 105 correspondientes en la muestra conduce a un cambio de espesor de capa (véase la figura 4). Este cambio de espesor de capa influye en la luz conducida a través de la trayectoria de rayo de medición 9 al soporte 46 y reflejada en la superficie de la capa delgada, que es desviada por el divisor de rayo 7 y representada en una disposición de detector 19. Preferentemente, la rama de medición (a la derecha del divisor de rayo 7) con la disposición de detector 19 está realizada de manera similar o incluso idéntica a la rama de referencia (a la derecha del divisor de rayo 7). En la forma de realización representada, la disposición de detector 19 puede ser por ejemplo un fotodiodo, un fotomultiplicador (multiplicador de fotoelectrones, abreviado por fotomultiplicador, en inglés, “photomultiplier tube”, PMT), una cámara CCD (Charge-Coupled Device), un CMOS (“Complementary Metal Oxide Semiconductor; semiconductor de óxido metálico complementario), un conjunto de diodos o un fotodiodo de avalancha. La rama de medición puede presentar antes de la disposición de detector 19 un sistema de lente 17 para la reproducción / el enfoque a la disposición de detector 19 y/o un filtro de detector 23, por ejemplo un filtro paso banda, o un filtro de paso largo o un filtro de paso corto.

Como ya se ha descrito con referencia a la figura 4, se usa para la medición preferentemente la reflexión múltiple en las superficies límite de la capa delgada, detectándose los rayos reflejados con las dos disposiciones de detector 19, 19'. Las dos disposiciones de detector 19, 19' están conectadas a una unidad de evaluación que no se describe en detalle aquí.

Para garantizar en la capa 103 delgada una buena mezcla y evitar una capa de agotamiento, según la invención, a la muestra 50 se irradia luz de un láser 32. Para la irradiación de la luz láser, en la figura 5, el segundo divisor de rayo 34 que ya se ha mencionado anteriormente se dispone por debajo del primer divisor de rayo 7. En otra forma de realización según la figura 6 en la que signos de referencia idénticos se refieren a componentes idénticos, el segundo divisor de rayo 34 está representado a título de ejemplo por encima del primer divisor de rayo 7. Con la ayuda del segundo divisor de rayo 34, la radiación láser 30 infrarroja emitida por el láser 32 y opcionalmente modificada con un medio óptico 33, por ejemplo lentes, o un sistema de lente, por ejemplo un colimador para la paralelización y/o el enfoque de la radiación láser infrarroja, puede acoplarse a la trayectoria de rayo de medición 9. El divisor de rayo 34 puede parecerse al divisor de rayo 7, ser idéntico, o presentar otras características. Por ejemplo, el divisor de rayo 34 puede ser un espejo dicróico o un “Hot Mirror” (espejo caliente). Cabe volver a destacar explícitamente que la radiación electromagnética 31 irradiada sirve para la medición, mientras que la radiación electromagnética 30 irradiada sirve para producir una convección.

También aquí se destaca explícitamente que la disposición experimental descrita anteriormente es solo uno de muchos ejemplos según la invención y que la invención en ningún caso se limita a una disposición especial de los medios ópticos descritos anteriormente. Especialmente, la disposición experimental no está limitada a la orientación representada. Por tanto, en lugar de desde arriba, la luz también puede venir desde abajo a la izquierda o a la derecha y se pueden desplazar o rotar de manera correspondiente los medios ópticos correspondientes. Además, el orden de los medios ópticos no está limitado a la forma de realización representada y se puede modificar conforme a las características deseadas para la irradiación y la medición. Según la invención, en lugar de la reflexión

representada también se puede medir una transmisión. Sin embargo, el experto verá fácilmente que el procedimiento según la invención para la generación de convecciones también puede implementarse fácilmente en una disposición experimental de transmisión de este tipo. También a este respecto se remite a la **figura 6** que muestra una disposición experimental muy similar a la figura 5, pero que irradia la luz IR en otro punto.

5 Las **figuras 2A y 2B** muestran a título de ejemplo la influencia de la orientación de un rayo láser IR 30 irradiado, con respecto a la gravitación sobre la convección térmica dentro de una cámara de muestra 45 en la que se encuentra una solución acuosa 50 con las partículas (no representadas) disueltas en esta. Están representados además los vectores de velocidad (flechas) y las líneas de circulación (líneas) de la convección térmica 90.

10 Si la radiación láser está orientada de forma antiparalela a la gravitación, tal como está representado en la figura 2A, la presión de rayo / presión de luz aumenta la convección térmica, es decir, la velocidad de circulación es mayor que cuando la radiación láser está orientada paralelamente o perpendicularmente con respecto a la gravitación.

15 Si la radiación láser está orientada paralelamente a la gravitación, como está representado en la figura 2B, la presión de rayo / presión de luz atenúa la convección térmica, la velocidad de circulación es menor que cuando la radiación láser está orientada de forma antiparalela o perpendicular con respecto a la gravitación.

20 Las figuras 7A y 7B muestran a título de ejemplo la irradiación de una radiación, preferentemente una radiación IR, por ejemplo una radiación láser 30, a la "ondulación" 45, llena de una solución acuosa 50, de una placa multiondulada, por ejemplo una placa multiondulada de 96, de 384 o de 1.536 ondulaciones. La radiación IR 30 irradiada produce una convección térmica 90 en la cámara de muestra "ondulación" 45 irradiada.

25 En la **figura 7A**, la radiación IR 30 se irradia a través un fondo transparente 47 de una placa multiondulada.

En la **figura 7B**, la radiación IR 30 no se irradia a través del fondo, sino directamente a la solución acuosa 50 en la cámara de muestra "ondulación" 45, aquí desde arriba.

30 Por ejemplo, esta placa multiondulada puede tener un fondo 48 no transparente, pero por ejemplo también un fondo transparente o un fondo parcialmente transparente.

La **figura 8** muestra a título de ejemplo la aplicación del procedimiento descrito, en una disposición experimental concreta, pero sin estar limitado a esta. A su vez, cifras de referencia idénticas se refieren a piezas idénticas o similares. La cifra de referencia 1a designa una fuente de luz que se usa para la medición. Por ejemplo, en la fuente de luz 1a puede tratarse de uno o varios LED o de uno o varios láseres y/o de uno o varios SLED (LED superluminescentes). La cifra de referencia 1b designa una fuente de luz que se usa para la medición. Por ejemplo, en la fuente de luz 1b puede tratarse de uno o varios LED, de uno o varios láseres y/o de uno o varios SLED (LED superluminescentes). Preferentemente, la fuente de luz 1b tiene otra longitud de onda u otra gama de longitudes de onda que la fuente de luz 1a. La luz de la fuente de luz 1a y/o 1b sirve preferentemente para la irradiación de una muestra 50 que ha de ser examinada. La luz irradiada por las fuentes de luz 1a y/o 1b se puede modificar mediante medios ópticos, por ejemplo mediante una lente 26 y/o un sistema de lente (no representado) o un aparato (no representado) o un filtro de polarización. A continuación, la luz de la fuente de luz 1a preferentemente pasa por un filtro de excitación 25, preferentemente un filtro paso banda, y la luz de la fuente de luz 1b pasa preferentemente por un filtro de excitación 24, preferentemente un filtro paso banda. Preferentemente, el filtro de excitación 24 tiene otra zona de transmisión que el filtro de excitación 25. El signo de referencia 23 se refiere a un filtro de detector opcional, por ejemplo un filtro paso banda o un filtro de paso largo o un filtro de paso corto o un paso dual o un filtro multipaso. En caso de fluorescencia, el filtro 23 también puede denominarse filtro de emisión.

50 La luz de las dos fuentes de luz de excitación preferentemente se combina, por ejemplo, por medio del espejo dicroico 28 y, a continuación, preferentemente por otro espejo dicroico 29 en dirección hacia el sistema de lente de objeto 38. El espejo dicroico 29 preferentemente también se usa para separar la luz de excitación de la luz de detección. Después de la reflexión en el espejo dicroico 29, la luz de excitación preferentemente pasa por otro espejo dicroico 34 ("Hot Mirror" / espejo caliente) y, a continuación, preferentemente es enfocada por el sistema de lente de objeto 38 a través del fondo 47 transparente de la placa multiondulada a la solución acuosa 50 en la cámara de muestra 45, preferentemente una "ondulación" de una placa multiondulada. Allí, la luz de excitación estimula la fluorescencia de partículas 105 fluorescentes, por ejemplo proteínas de fluorescencia intrínseca y/o biomoléculas marcadas con fluorescencia u otras sustancias fluorescentes. La luz fluorescente es recogida por el sistema de lente de objeto 38, preferentemente una lente, una combinación de lentes o un objetivo de microscopio, a continuación, pasa por el espejo dicroico 34 y 29, después pasa por el filtro de detección 23, preferentemente un filtro de emisión, por ejemplo un filtro paso banda, un filtro de paso dual o un filtro multipaso, y después es enfocada por una lente 17, por ejemplo una esfera, al detector 19, por ejemplo un fotodiodo, un PMT, una cámara CCD, una cámara CMOS, un haz de diodos, un fotodiodo de avalancha.

65 Por medio de este detector pueden medirse la intensidad y/o la fase y/o la secuencia temporal de la intensidad de la fluorescencia y después se pueden procesar o almacenarse electrónicamente.

5 La radiación infrarroja para producir la convección térmica preferentemente se produce por medio de un láser infrarrojo 32 de fibra acoplada. La fibra del láser se acopla por ejemplo por medio de un acoplamiento de fibra 27, preferentemente con funcionalidad colimadora, a la óptica o al sistema óptico. La radiación infrarroja se puede modificar mediante medios ópticos conocidos, por ejemplo, mediante una lente 26 y/o un sistema de lente (no representado) o un aparato (no representado) o un filtro de polarización. Por ejemplo, puede ser paralelizada o enfocada por la lente 26, por ejemplo una esfera. A continuación, la radiación infrarroja es reflejada al sistema de lente de objeto 38 por el espejo dicróico 34 ("Hot Mirror" / espejo caliente). Entonces, el sistema de lente de objeto 38 enfoca la radiación infrarroja 30 a través del fondo 47 transparente de la placa multiondulada a la solución acuosa 50 de la cámara de muestra 45, preferentemente una "ondulación" de una placa multiondulada. La placa multiondulada preferentemente es una placa de 96 ondulaciones o una placa de 384 ondulaciones o una placa de 1.536 ondulaciones. Allí, la radiación infrarroja 30 produce una convección térmica 90 definida según el enfoque, para la mezcla de las partículas 105 en la solución acuosa 50.

10 Las partículas son por ejemplo biomoléculas tales como ADN, ARN, APN, proteínas, anticuerpos, antígenos, o pequeñas moléculas, células, virus, bacterias, microbeads, nanobeads, nanopartículas, polímeros, péptidos. Por ejemplo, el dispositivo también puede emplearse para la detección y la cuantificación de la agregación de biomoléculas, por ejemplo la agregación de proteínas o de anticuerpos terapéuticos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la mezcla de líquidos (50) o partículas con un líquido (50) con los pasos:

- 5 a. la puesta a disposición de un volumen de líquido (50) en una microcavidad de una placa microondulada de 384 o de 1.536;
 b. la puesta a disposición de varios LED IR
 c. la generación de una corriente de convección térmica en al menos una superficie límite entre el volumen de líquido y la microcavidad mediante la irradiación simultánea de radiación IR (30) de los varios LED a varias
 10 de las cavidades,

causando la corriente de convección una reducción de una capa de agotamiento en la superficie límite o un aumento de una capa enriquecida en la superficie límite, de manera que se mejoran procedimientos de medición basados en superficies límite.

15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el líquido (50) es una solución acuosa.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la radiación (30) está orientada de forma paralela y/o antiparalela a la gravitación y/o contiene una componente orientada perpendicularmente a la gravitación.

20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que con la radiación (30) irradiada se produce un gradiente de temperatura de 0,001 k/μm (=1 K/mm) a 2 k/μm (=2.000 K/mm).

25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que una zona de detección (80) para la medición de características del líquido o de las partículas en el líquido está situada a una distancia de la zona en la que se irradia la radiación (30).

30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que se producen velocidades de circulación dentro de la corriente de convección de 0,0005 mm/s a 2mm/s.

7. Procedimiento para examinar acciones recíprocas moleculares en y/o dentro de una capa (80) delgada en un volumen de líquido por medio de un procedimiento de medición basado en superficies límite, con los pasos:

- 35 - la puesta a disposición de un volumen de líquido (50) con partículas presentes en este en una microcavidad de una placa microondulada de 384 o de 1.536;
 - la puesta a disposición de varios LED IR;
 - la irradiación de una radiación IR de varios LED IR a volúmenes de líquido (50) de las múltiples microcavidades de la placa microondulada para generar la corriente de convección térmica,
 - la medición de una acción recíproca específica o inespecífica de las partículas con una superficie límite de
 40 la microcavidad con la ayuda del procedimiento de medición basado en superficies límite,
 - la caracterización de la acción recíproca de las partículas con la ayuda de la medición.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que

- 45 i) la medición de la acción recíproca se realiza mediante espectroscopia de interferencia reflectométrica (RIfS);
 ii) la medición de la acción recíproca se realiza mediante resonancia de plasmones superficiales ("Surface Plasmon Resonance", SPR)
 iii) la medición de la acción recíproca se realiza mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA /
 50 "Enzyme Linked Immunosorbent Assay),
 iv) la medición de la acción recíproca se realiza mediante microbalanzas de cristal de cuarzo ("Quartz Crystal Microbalance", QCM),
 v) la medición de la acción recíproca se realiza mediante onda acústica superficial, ("surface acoustic wave"; SAW), o
 55 vi) la medición de la acción recíproca es al menos un procedimiento del grupo: espectroscopia de interferencia reflectométrica (RIfS), interferometría de biocapa (BLI), resonancia de plasmones superficiales ("Surface Plasmon Resonance", SPR), microbalanzas de cristal de cuarzo ("Quartz Crystal Microbalance", QCM), onda acústica superficial, abreviada por OAS ("surface acoustic wave"; SAW), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), nanoporos o transistores (secuenciación de próxima generación / "Next Generation Sequencing").
 60

9. Dispositivo para mezclar líquidos (50) o partículas con un líquido (50), para la realización de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8 con:

- 65 a. una placa microondulada de 384 o de 1.536, para recibir un volumen de líquido (50); y
 b. varios LED IR para la emisión de radiación IR (30);

- c. un equipo para la irradiación de radiación IR (30) a varios volúmenes de líquido de la placa microondulada.

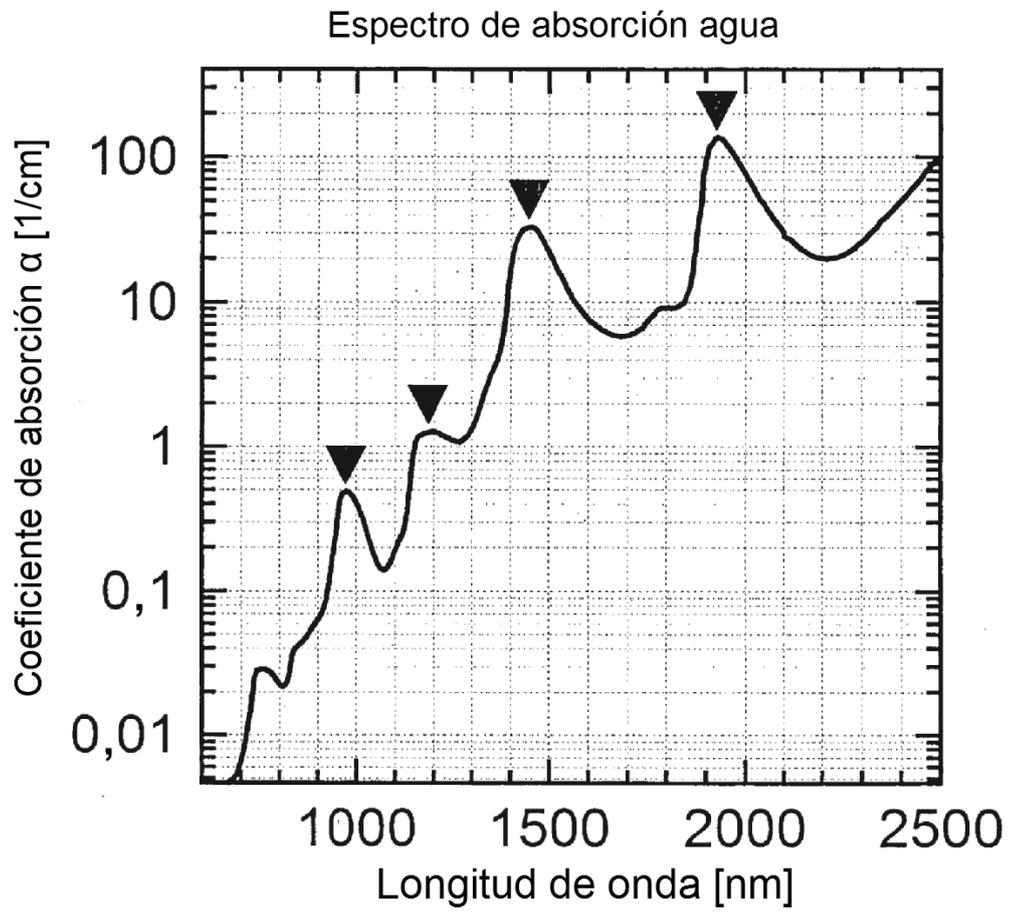


Fig. 1

(A) Radiación láser antiparalela a la gravitación

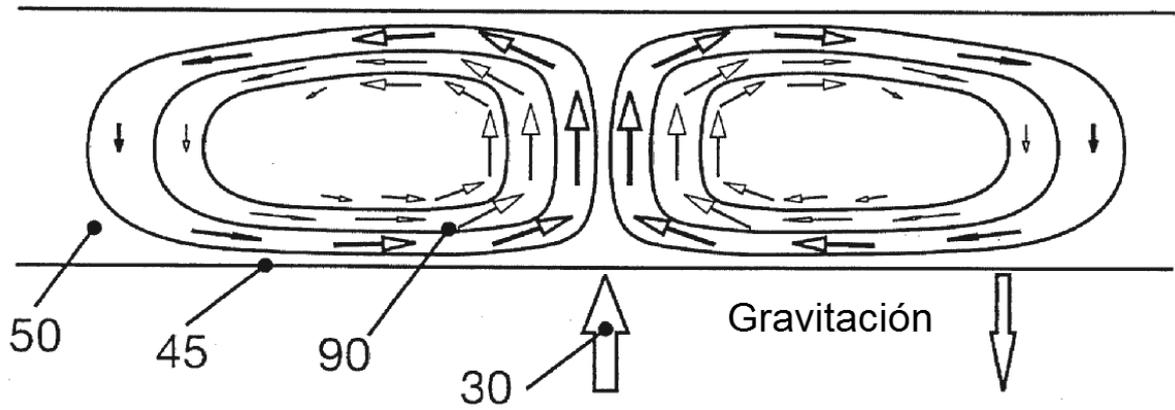


Fig. 2A

(B) Radiación láser paralela a la gravitación

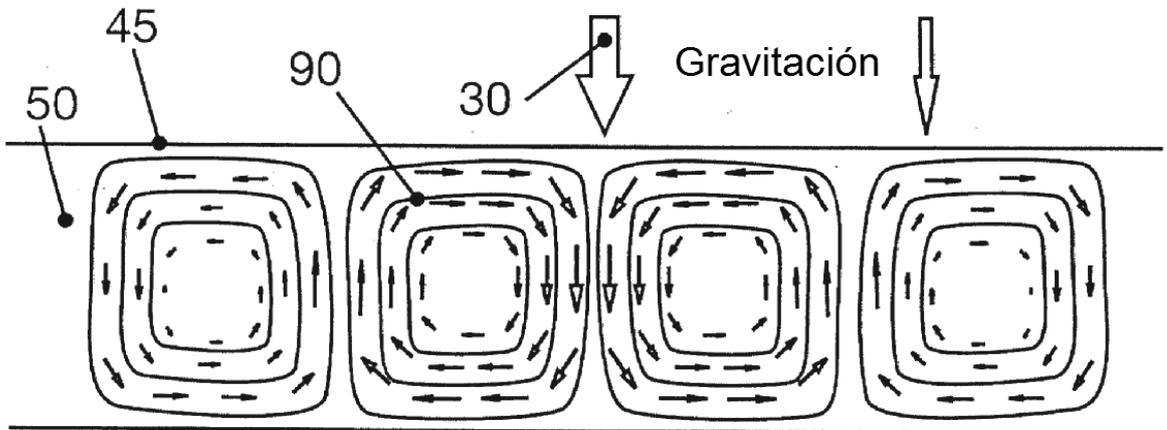


Fig. 2B

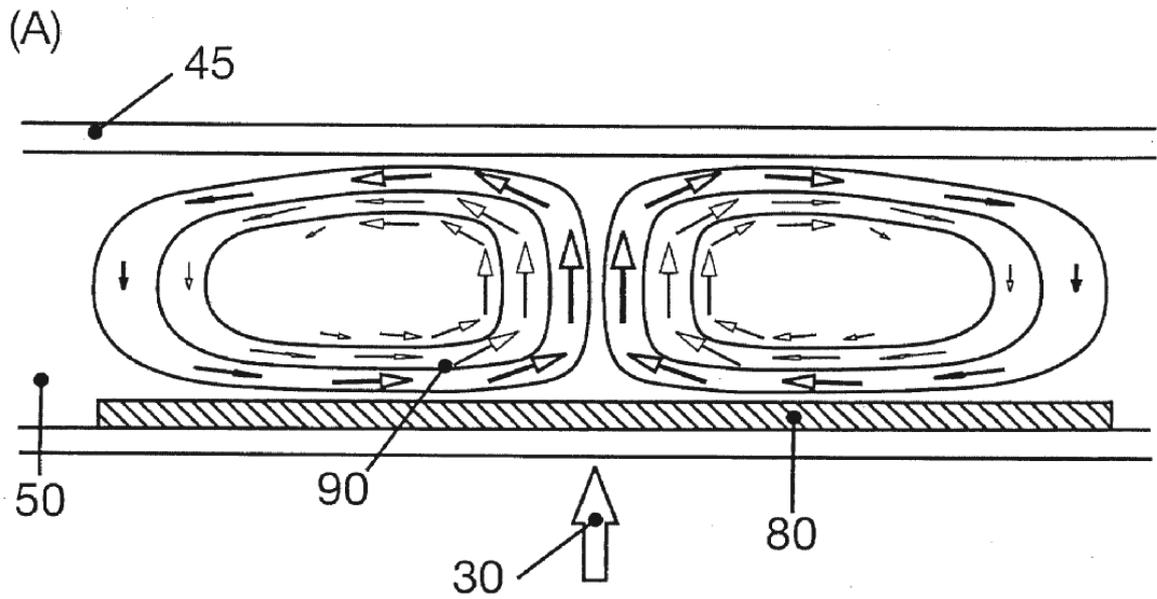


Fig. 3

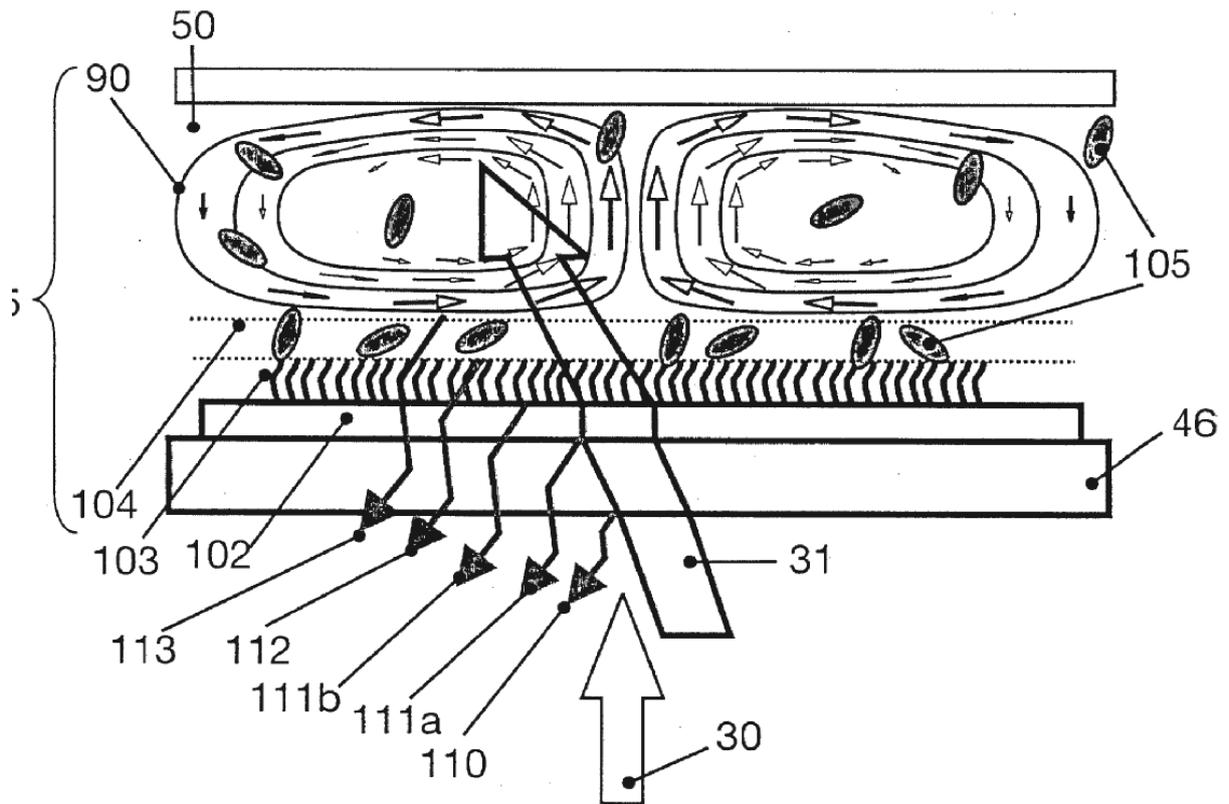


Fig. 4

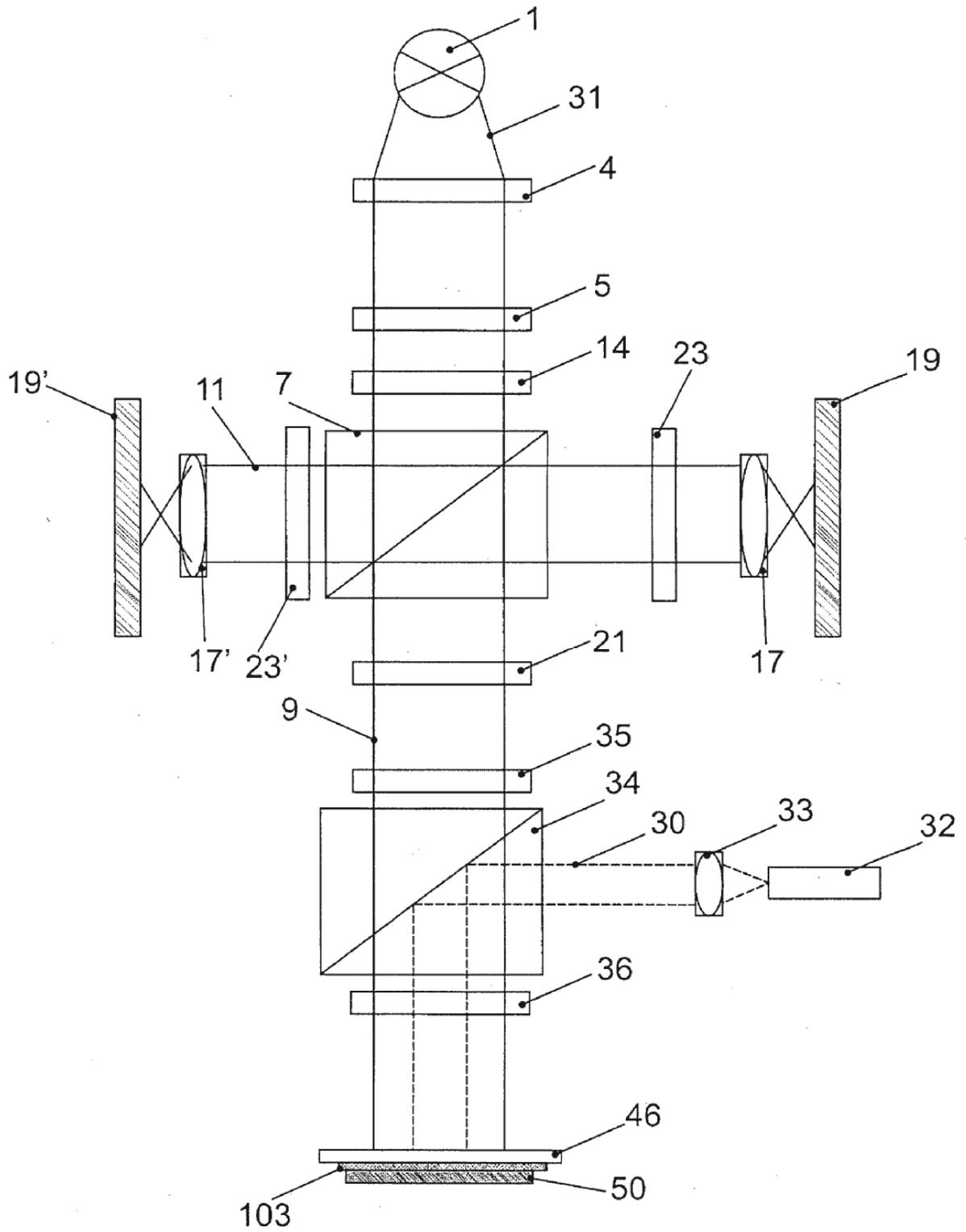


Fig. 5

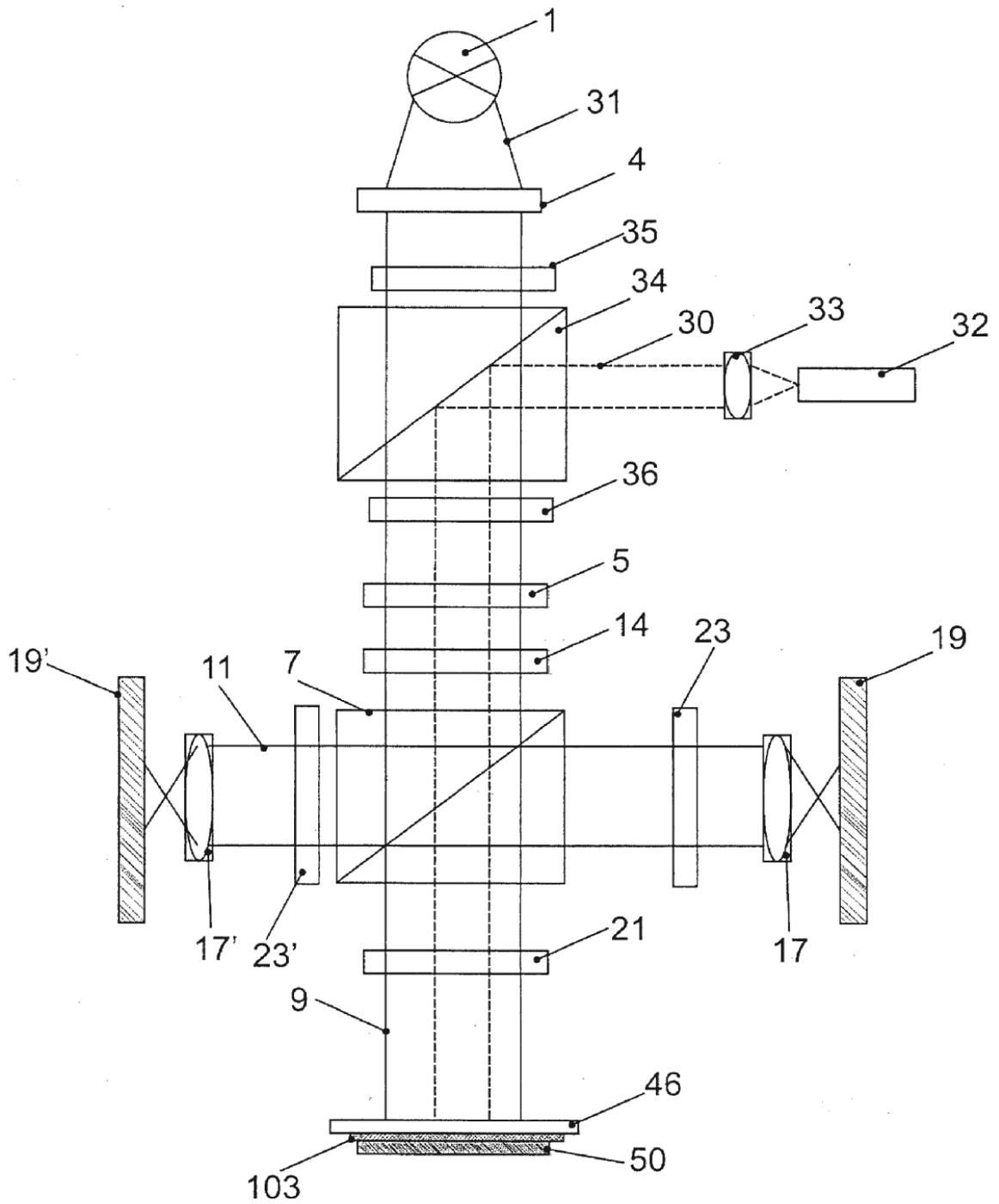
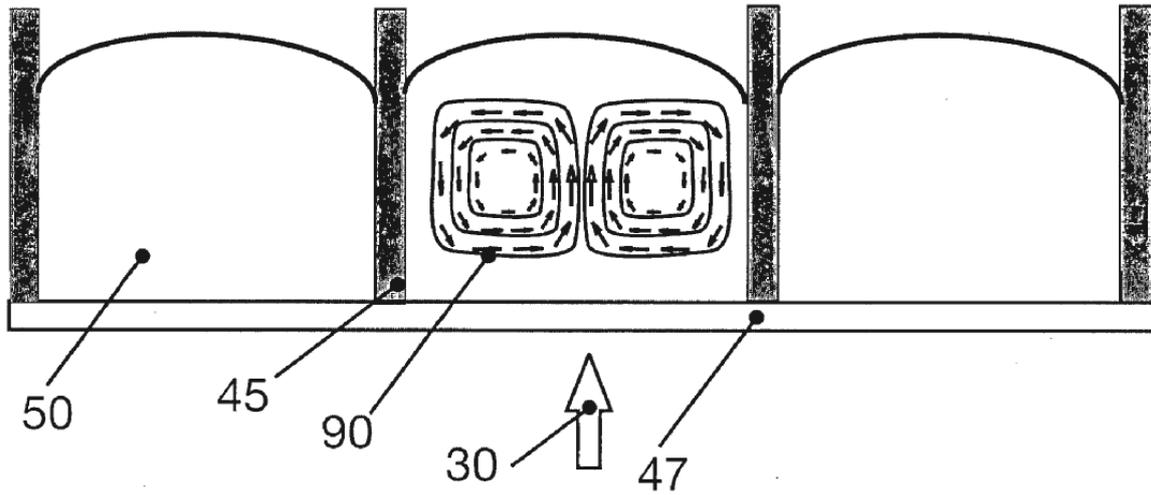


Fig. 6

(A) Placa multiondulada irradiación a través del fondo



(B) Placa multiondulada irradiación directamente al líquido

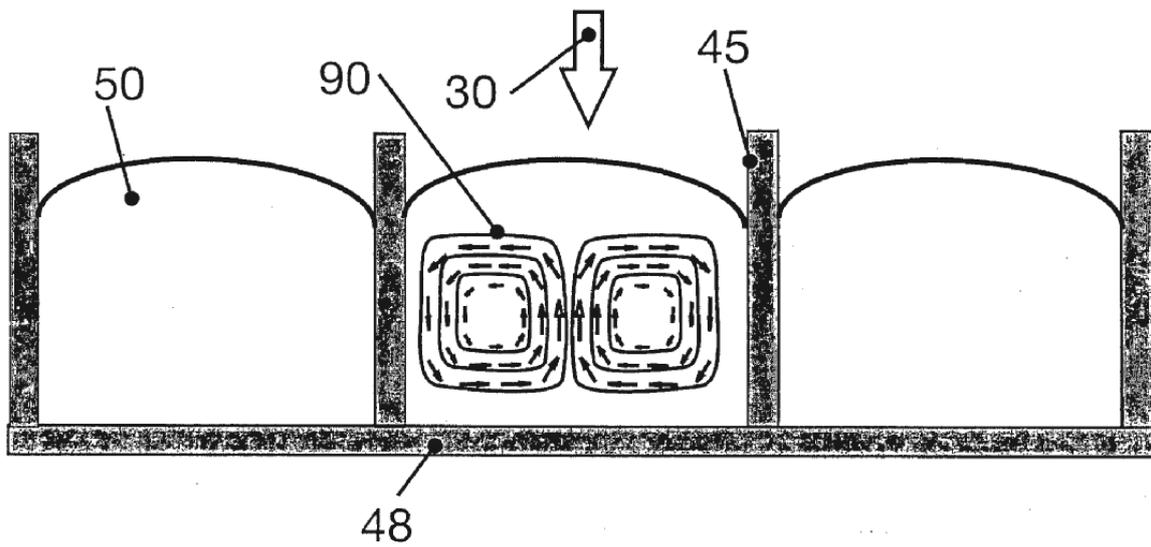


Fig. 7

Placa multiondulada irradiación y detección a través del fondo

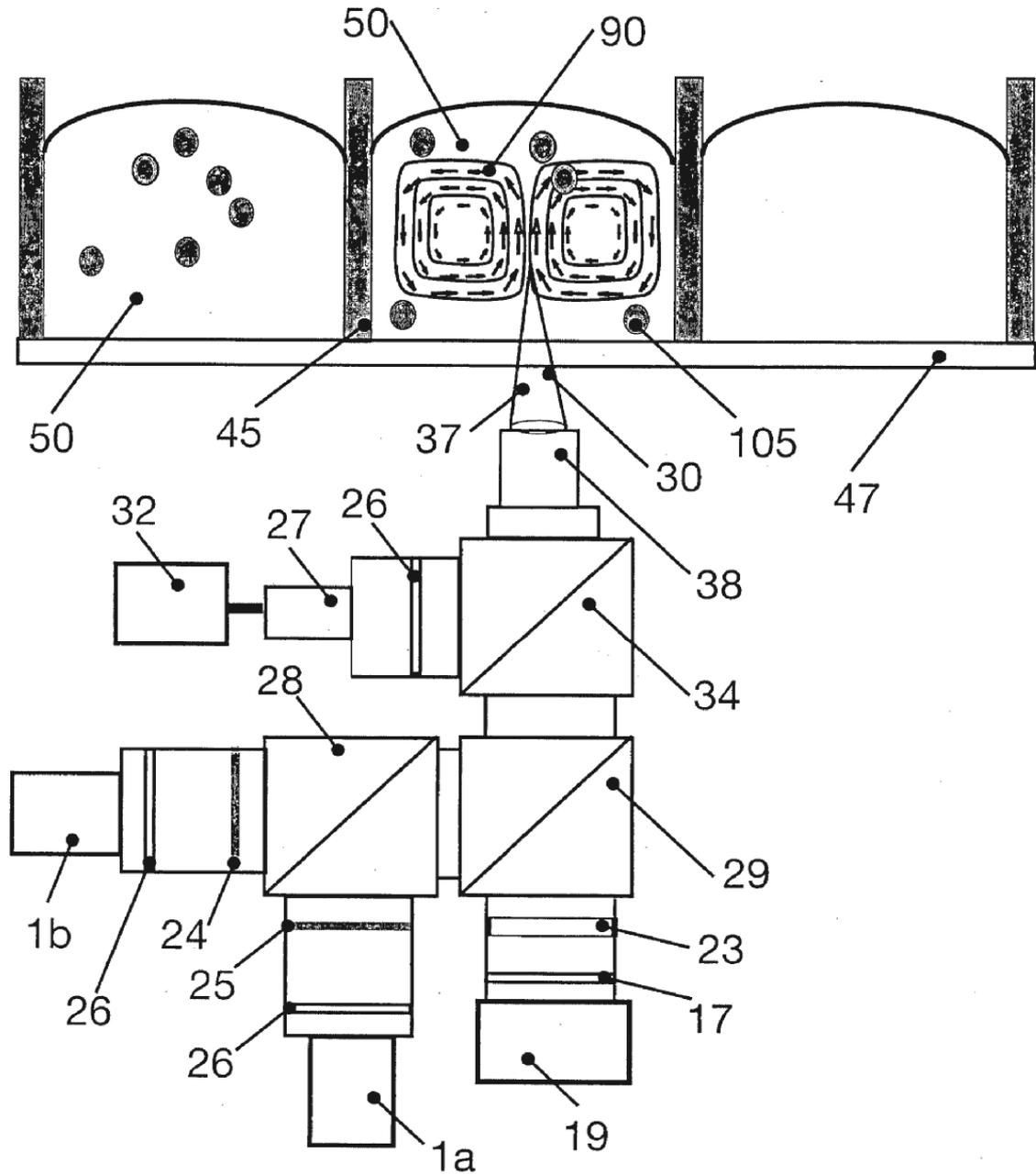


Fig. 8