

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 084**

51 Int. Cl.:

B05B 13/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2014 PCT/EP2014/055722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14147229**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2014 E 14714624 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2976159**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para humectar una muestra con un aerosol**

30 Prioridad:

22.03.2013 DE 102013005010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2018

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN -
DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR
GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH) (100.0%)
Ingolstädter Landstrasse 1
85764 Neuherberg, DE**

72 Inventor/es:

**SCHMID, OTMAR;
LENZ, ANKE-G.;
LENTNER, BERND y
EICKELBERG, OLIVER**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 678 084 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

Dispositivo y procedimiento para humectar una muestra con un aerosol

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un dispositivo para humectar una muestra con un aerosol, preferiblemente una muestra biológica, por ejemplo una muestra celular, en particular en la capa límite aire-líquido. Además, la invención se refiere también a un procedimiento correspondiente para humectar una muestra con un aerosol. En el caso de la muestra se trata en particular de células y preferiblemente de células epiteliales, de manera especialmente preferible de células pulmonares.

Estado de la técnica

10 A menudo es necesario exponer una muestra, por ejemplo células, en experimentos a una sustancia y en particular a una sustancia farmacéuticamente activa, por ejemplo para el examen de principios activos, o a una sustancia tóxica, por ejemplo para investigaciones de toxicidad.

15 Habitualmente, para ello se realizan ensayos celulares *in vitro*. A este respecto se añade un principio activo o una sustancia toxicológicamente activa a una muestra de células en denominadas condiciones de cultivo celular sumergidas. En tales condiciones de cultivo celular sumergidas, las células están cubiertas completamente por el medio celular y la sustancia de prueba, por ejemplo una sustancia farmacéuticamente activa o una tóxica, se transfiere mediante pipeta directamente al medio celular.

20 Sin embargo, para células epiteliales, es decir células que delimitan el cuerpo hacia fuera, por ejemplo células epiteliales pulmonares, células cutáneas o células retinianas, esta situación no es realista, dado que las células epiteliales forman en el cuerpo normalmente una capa límite aire-líquido (LFG). Es decir, a un lado de las células epiteliales hay aire o gas en general y al otro lado hay tejido intersticial o líquido en general.

25 Para los estudios y experimentos en tales células, la inmersión completa de tales células en el medio celular no es fisiológicamente realista. Sin embargo, al mismo tiempo, los estudios o experimentos en tales células son a menudo de interés. Esto es aplicable en particular para estudios de efectividad y de toxicidad con sustancias administradas por inhalación, por ejemplo para terapias por inhalación o estudios para la seguridad en el puesto de trabajo en el trato con materiales aerosolizables, en particular nanomateriales.

30 Se utilizan investigaciones en la LFG, por ejemplo, para analizar los efectos de sustancias portadas por aerosol (por ejemplo principios activos, toxinas, nanopartículas) sobre células. A este respecto, tiene prioridad en particular el efecto sobre células que se encuentran en la superficie de contacto aire/líquidos corporales, como por ejemplo células epiteliales del pulmón, de la piel o de la retina. En la terapia por inhalación se aplican principios activos aerosolizados de manera dirigida sobre el epitelio pulmonar, para tratar enfermedades pulmonares o enfermedades sistémicas. Además, el pulmón ofrece también la puerta de entrada más importante para el trato con muchas sustancias tóxicas o potencialmente tóxicas, como por ejemplo polvo fino ambiental o nanomateriales en el lugar de trabajo.

35 Para poder investigar tales células epiteliales en condiciones lo más fisiológicas posible, se han desarrollado diferentes métodos que simulan un medio de LFG de este tipo. En particular, por medio de insertos Transwell pueden cultivarse células en la LFG también en placas de microtitulación estandarizadas. La cultivación de células epiteliales en la LFG es básicamente fisiológicamente más realista y por tanto en cuanto al efecto de las sustancias posiblemente más informativa que los cultivos celulares sumergidos descritos anteriormente.

40 Por tanto, existe una necesidad básica de proporcionar un sistema adecuado para estudios y experimentos en tales cultivos celulares de LFG, con el que pueda aplicarse una sustancia uniformemente en un grosor de capa reducido (por ejemplo aproximadamente 10-100 μm) sobre cultivos celulares de LFG. Tales sustancias comprenden normalmente principios activos aerosolizados líquidos, pero pueden comprender también sustancias secas. En particular, para estudios farmacéuticos con principios activos en parte muy caros son ventajosas una alta eficacia de deposición y una distribución uniforme del principio activo aerosolizado sobre las células de LFG. Dado que hasta el momento no se ha establecido ni un dispositivo adecuado ni un procedimiento correspondiente, la utilización de los cultivos celulares de LFG para estudios y experimentos farmacéuticos es actualmente todavía relativamente limitada.

50 Hay ya algunos sistemas que tienen por objetivo cubrir células (pulmonares) en la LFG con sustancias aerosolizadas. Estas pueden, partiendo del planteamiento de solución usado para los retos tecnológicos posteriores, dividirse en diferentes categorías. Por un lado se plantea el reto del transporte de la sustancia aerosolizada a las células (transporte) y por otro lado el objetivo de la deposición del aerosol sobre las células (deposición).

55 Según el sistema del documento DE102009016364A1, se desplaza aerosol mediante un flujo de aire a las células (transporte: corriente de aire) y se deposita por medio de difusión y/o sedimentación (según el tamaño y la masa del aerosol) sobre las células.

Además se conoce usar una corriente de aire para el transporte de un aerosol, teniendo lugar la deposición mediante precipitación electrostática. En este caso se cargan en primer lugar los aerosoles electrostáticamente y entonces se depositan en un campo eléctrico electroforéticamente sobre las células.

5 También se conoce aplicar las células desde una separación relativamente reducida mediante “pulverización” directa. En este caso, el transporte tiene lugar mediante la generación de aerosoles con una alta velocidad (por ejemplo por medio de una boquilla de alta presión o de un flujo de aire portante rápido) y la deposición sobre las células mediante impacto inercial. Este tipo de sistemas tiene con frecuencia la desventaja de que no está garantizada la distribución uniforme de los aerosoles sobre las células o que el funcionamiento es técnicamente muy complejo.

10 A menudo, los sistemas conocidos pueden usarse solo para aerosoles secos toxicológicamente relevantes, pero no para aerosoles líquidos farmacéuticos. Además, los tamaños de partícula que pueden usarse están a menudo limitados, por ejemplo a menos de 1 μm . Aerosoles más grandes, de por ejemplo más de 1 μm , tal como se usan para la terapia por inhalación, a menudo no son posibles.

15 Además, muchos de los sistemas conocidos tienen una tasa de deposición de principio activo muy reducida, de por ejemplo aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ o aproximadamente 0,1 $\text{nl}/\text{cm}^2/\text{h}$ para disoluciones acuosas (Paur *et al.* Journal of Aerosol Science 42 (2011) 668-692, y en este documento, tabla 3), y requieren por ello tiempos de exposición muy largos, desde varias horas hasta algunos días, para provocar respuestas biológicas celulares medibles. Los procedimientos y aparatos correspondientes son muy costosos y requieren mucho tiempo y dificultan además el trabajo con células, que solo pueden cultivarse durante aproximadamente 7 días. Además, el funcionamiento así como el control de calidad resultan complejos. La eficacia de deposición (celular) (parte porcentual del material invertido en el generador de aerosol, que se deposita sobre las células) de los sistemas conocidos se encuentra por regla general muy por debajo del 100%, por ejemplo por debajo del 1%, lo que es atribuible en ocasiones a una eficacia de precipitación reducida de los aerosoles sobre las células y a pérdidas (residuos) de sustancia en el generador de aerosol y en los conductos de suministro. Los sistemas de deposición electrostática demuestran ser además desventajosos, dado que las corrientes de carga que no pueden evitarse pueden tener una influencia de falseamiento sobre la respuesta celular. Además, algunos de los sistemas conocidos son desventajosos en el sentido de que no permiten una distribución uniforme o distribución equitativa de la sustancia sobre las células. Por consiguiente, en particular no es posible una dosimetría comparable y reproducible sobre las células. Debido a las condiciones incontroladas solo puede determinarse difícilmente una relación dosis-efecto fiable. Finalmente, las disoluciones que depositan la sustancia mediante impacto inercial son desventajosas, dado que las células sufren, entre otros, las altas velocidades de flujo del aerosol.

20 La mayoría de los sistemas conocidos tienen en común que el aerosol se porta por medio de un flujo de aire continuo a una cámara de exposición, lo que condiciona una complejidad tecnológica correspondiente. Un ejemplo para un sistema de este tipo es el sistema Air-Liquid-Interface Cell Exposure, abreviado ALICE (descrito en Lenz, A.G., E. Karg, B. Lentner, V. Dittrich, C. Brandenberger, B. Rothen-Rutishauser, H. Schulz, G. A. Ferron y O. Schmid, A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles, Particle and Fibre Toxicology 6 (32), 1-17, 2009). Una nube de aerosol se transporta por medio de un flujo de aire externo desde un lado al interior de una cámara de exposición, allí cae la nube de aerosol hacia abajo, forma un vórtice y forma una niebla, que se sedimenta sobre las células y de este modo las humecta con sustancia. El aire vaciado del aerosol se extrae de nuevo al otro lado de la cámara de exposición. Este sistema presenta una eficacia de deposición celular relativamente reducida de aproximadamente el 7% y ocupa relativamente mucho espacio (aproximadamente 1 m^3) y por ello no puede hacerse funcionar bajo una cabina de flujo laminar. Además, presenta una construcción técnica muy complicada y por ello tiene un funcionamiento más complejo. Entre otros, el sistema necesita un humidificador de aire, una bomba y un medidor de flujo de aire para generar un flujo de aire externo así como una trampa de gotas, para evitar perturbaciones durante el transcurso de la exposición. Además, el nebulizador está dispuesto lateralmente junto a la cámara de exposición y el sistema se hace funcionar con un flujo de aire externo, en particular es decir no libre de un flujo de aire.

25 Otro procedimiento que se hace funcionar libre de flujo de aire, se presentó por F. Blank en Blank F, Rothen-Rutishauser BM, Schurch S, Gehr P: An optimized *in vitro* model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. Journal of Aerosol Medicine-Deposition Clearance and Effects in the Lung, 19(3):392-405, 2006. En este procedimiento se humecta una muestra mediante la pulverización directa, estando situado el pulverizador 12 cm por encima de la muestra. El sistema genera una pulverización de aerosol y deposita el aerosol por medio de impacto inercial sobre la muestra. No se utiliza ni se aprovecha una sedimentación y no se utilizan ni se aprovechan efectos de nube. Además, el sistema está abierto (sin paredes laterales o zona de tapa) y mediante el procedimiento proporcionado en este caso se consigue solo una eficacia de deposición no calificada pero probablemente relativamente reducida. Además, una pulverización de este tipo presenta una distribución de gotas, que es heterogénea ya tras una distancia muy reducida desde el sitio de generación. Por tanto, un procedimiento de este tipo no es adecuado para proporcionar una distribución homogénea de sustancias sobre muestras que están dispuestas sobre una superficie von 100 cm^2 o más. Además, la reproducibilidad de la humectación de las muestras no está garantizada, dado que el nebulizador usado (Microsprayer, Penn-Century Inc., EE.UU.) se hace funcionar manualmente.

Por tanto, un primer objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo alternativo y preferiblemente mejorado o un procedimiento mejorado. Este dispositivo o este procedimiento deben atenuar o solucionar en particular los problemas mencionados anteriormente.

5 Por tanto, con otras palabras, un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo o un procedimiento para la aplicación rápida, sencilla, uniforme y/o reproducible de una sustancia o de un aerosol (en particular de una sustancia líquida o sólida) sobre una muestra, en particular sobre un cultivo celular de LFG. Además, este dispositivo o este procedimiento debe ser adecuado para que el aerosol se aplique con una alta tasa de deposición (masa de aerosol por tiempo por superficie recubierta por células).

10 Igualmente, un objetivo de la presente invención es diseñar este dispositivo o este procedimiento de manera eficaz, fácilmente manejable y dosimétricamente exacta. Preferiblemente, el propio procedimiento no debe provocar ningún efecto biológico en las células o en cortes de tejido.

Sumario de la invención

15 Este objetivo se alcanza o estos objetivos se alcanzan mediante el dispositivo según la invención y el procedimiento según la invención, en particular como se describe en las reivindicaciones adjuntas, los aspectos posteriores y/o la descripción adicional. En particular, la presente invención se refiere a un sistema novedoso (dispositivo, procedimiento y uso) para la exposición a aerosol de una muestra. En el caso de esta muestra puede tratarse de una muestra biológica, por ejemplo de células. Estas células pueden estar en forma de células individuales, como unión de células (hasta órganos), cortes de tejido y/o células en cultivo, por ejemplo como césped de células en cultivo. En particular puede tratarse de células en la capa límite aire-líquido (LFG). Sin embargo, además, en el caso
20 de esta muestra puede tratarse también de una muestra de material de trabajo, por ejemplo de metal, plástico y/o vidrio.

Según un primer aspecto, la invención comprende un dispositivo para humectar al menos una muestra por medio de un aerosol. A este respecto, por un aerosol se entiende una mezcla de una sustancia con un gas, por ejemplo aire.
25 La sustancia puede estar en forma líquida o sólida, por ejemplo como gotas o polvo. En otras palabras, en el caso de un aerosol se trata por tanto de una mezcla de partículas en suspensión sólidas y/o líquidas y un gas. El dispositivo comprende paredes laterales, que de manera preferiblemente esencial son verticales, así como una zona de fondo. La zona de fondo está dispuesta en el uso normal, en particular en cuanto a la dirección de la gravitación, en la zona inferior del dispositivo. Se delimita, en particular lateralmente, preferiblemente por paredes laterales. La zona de fondo está adaptada preferiblemente para alojar o para actuar conjuntamente con un dispositivo de posicionamiento para posicionar la muestra o presenta uno de este tipo. El dispositivo comprende además una zona de tapa, que está opuesta verticalmente a la zona de fondo (arriba), y que está delimitada, en particular lateralmente, preferiblemente por las paredes laterales verticales. La zona de tapa está adaptada preferiblemente para alojar o para actuar conjuntamente con una tapa o un techo o presenta uno de este tipo. El dispositivo forma una cámara de exposición a aerosol. Por el término cámara de exposición se entiende en particular el espacio que está definido por
35 el dispositivo, y que está separado en particular por las paredes laterales, la zona de fondo y la zona de tapa del entorno. Comprende además y/o está configurada para actuar conjuntamente con un dispositivo para la generación de aerosol, que también se denomina dispositivo de aerosolización, preferiblemente un dispositivo de nebulización para generar un aerosol líquido. Un dispositivo para la generación de aerosol es un dispositivo que según la conformación y el uso puede generar una niebla, una nube o un aerosol de gotas. A este respecto, el dispositivo de aerosolización está dispuesto preferiblemente en la proximidad de la zona de tapa y en particular en la, por encima o por debajo de la zona de tapa o tapa, preferiblemente en cualquier caso en la vista en planta dentro de o entre la(s) pared(es) lateral(es). A este respecto, el dispositivo y/o el dispositivo de aerosolización está(n) adaptado(s) para que el aerosol pueda liberarse en la dirección de la zona de fondo. El dispositivo de aerosolización está dispuesto por encima de la zona de fondo o puede disponerse en la misma de tal manera que el dispositivo de aerosolización cubre al menos parcialmente la zona de fondo en una vista en planta vertical y está dispuesto de manera preferible aproximadamente de manera centrada con respecto a la misma. El dispositivo presenta preferiblemente medios adecuados para posicionar y/o sujetar el dispositivo de aerosolización. Mediante el dispositivo según la invención puede humectarse la muestra con una sustancia.

50 El dispositivo de posicionamiento permite disponer de manera adecuada en particular al menos una muestra, en particular una muestra celular y preferiblemente células epiteliales, preferiblemente en la LFG. A este respecto, el dispositivo de posicionamiento está configurado preferiblemente a modo de placa y presenta preferiblemente una o varias cavidades para la muestra o retener la muestra. Un ejemplo preferido de un dispositivo de posicionamiento es una placa de microtitulación. Ejemplos adicionales son placas Petri o portaobjetos. Las cavidades del dispositivo de posicionamiento están configuradas preferiblemente para alojar un medio nutritivo para células así como un elemento auxiliar de posicionamiento, en particular insertos Transwell, con cuya ayuda pueden disponerse las
55 células en la LFG.

60 La zona de fondo del dispositivo está configurada para alojar un dispositivo de posicionamiento o para actuar conjuntamente con uno de este tipo. Para ello, la zona de fondo está configurada, por ejemplo, para encerrar lateralmente un dispositivo de posicionamiento o para ofrecer espacio para un dispositivo de posicionamiento. La zona de fondo puede presentar una placa de fondo, que cierra la abertura de fondo formada por las paredes

laterales total o al menos parcialmente. El dispositivo de posicionamiento puede disponerse sobre la placa de fondo. El dispositivo de posicionamiento puede estar configurado, por ejemplo, como una, dos, tres o también más de tres placas de microtitulación. La zona de fondo está configurada para ello preferiblemente para alojar tal número de placas de microtitulación, preferiblemente mediante una placa de fondo correspondiente con una cavidad para situar la placa de microtitulación, que está adaptada a la geometría de las paredes laterales. Esto puede ser especialmente ventajoso, dado que el dispositivo descrito anteriormente puede usarse entonces con los sistemas existentes. Preferiblemente estas son placas de microtitulación. Sin embargo, el dispositivo de posicionamiento también puede estar configurado individualmente. Preferiblemente, el dispositivo de posicionamiento comprende elementos para medir y/o regular una temperatura, preferiblemente con ayuda de un circuito de agua o de un dispositivo de control térmico eléctrico, por ejemplo una calefacción, elementos para el abastecimiento de la muestra, por ejemplo con medio nutritivo, y/o elementos para medir el peso del aerosol depositado, preferiblemente con ayuda de una o varias microbalanza(s) de cristal de cuarzo. Una microbalanza de cristal de cuarzo de este tipo es adecuada preferiblemente y en particular para la determinación directa, *in situ* (en tiempo real) de la cantidad de sustancia depositada sobre la muestra. El dispositivo de posicionamiento está configurado preferiblemente para la humectación de 6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536 muestras, o 2 x (6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536) o 3 x (6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536) o 4 x (6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536) muestras.

El dispositivo descrito en el presente documento posibilita depositar un aerosol de manera adecuada y ventajosa sobre una muestra y humectarla. En particular, el dispositivo posibilita de manera sencilla y eficaz una humectación rápida y homogénea de una y especialmente de varias muestras. A este respecto, han demostrado ser ventajosos en particular la construcción del dispositivo o de la cámara de exposición así como el posicionamiento del dispositivo de aerosolización en relación con el dispositivo así como con la muestra. En particular, el dispositivo permite mediante el dispositivo de aerosolización la formación de una nube de aerosol, en particular de una nube, para la que son aplicables al menos esencialmente las leyes del movimiento de una nube. El dispositivo posibilita además que esta nube caiga, preferiblemente mediante el propio movimiento de la nube, en particular aprovechando las leyes de movimiento físicas de una nube así como la gravitación, y por consiguiente permite humectar uniformemente la zona de fondo de la cámara, preferiblemente el dispositivo de posicionamiento, y con ello la muestra rápidamente, por regla general en menos de 3 min. En este caso, el dispositivo posibilita además el descenso sin obstáculos de la nube especialmente sin un flujo de aire suministrado o generado (libre de corriente de aire o libre de flujo de aire), que influya por ejemplo en el movimiento del aerosol y tal como es el caso por ejemplo en el estado de la técnica. Ventajosamente, el aerosol ya se genera libre de flujo de aire, es decir sin proporcionar un flujo de aire. Un flujo de aire de este tipo se utiliza en el estado de la técnica por ejemplo para generar el aerosol por ejemplo por medio de una boquilla o para hacer pasar el aerosol por la muestra y con ello una evacuación parcial del aerosol. En el caso de un suministro libre de flujo de aire, todo el aerosol generado se queda en la cámara de exposición y puede por consiguiente depositarse de manera muy eficaz mediante la gravitación y una velocidad inicial de la nube en la dirección de la muestra sobre la muestra. Un ejemplo de un dispositivo de aerosolización libre de flujo de aire de este tipo son los nebulizadores de membrana oscilante conocidos en el estado de la técnica. Se prefiere que el dispositivo de aerosolización esté configurado de tal manera que el aerosol saliente tenga una cierta velocidad inicial en la dirección de la zona de fondo que sea diferente de cero.

Por nube se entiende preferiblemente en el presente documento que la velocidad de caída del conjunto de aerosol (bajo la influencia de la gravedad) sea al menos mayor en un factor de 10 que la velocidad de caída de los aerosoles individuales (o de la nube diluida) y en particular debido al movimiento propio de la nube se consiga una velocidad de caída media de más de 1 cm/s, preferiblemente más de 3 cm/s, de manera especialmente preferible más de 10 cm/s. En una nube aparece por consiguiente preferiblemente un efecto de sotavento: Al menos algunas de las partículas de aerosol, que están en el interior de la nube, experimentan una resistencia aerodinámica reducida, dado que se encuentran a sotavento de las partículas de aerosol externas o que la rodean. Un requisito para ello es en particular que la nube sea suficientemente densa. El volumen de partículas de aerosol es para ello de al menos el 10⁻⁴%, preferiblemente al menos el 10⁻³%, de manera especialmente preferible el 10⁻²% del volumen de aire en el que está contenido.

En particular, el dispositivo puede garantizar que el aerosol, preferiblemente al menos en los primeros 1 a 10 segundos de la exposición, se forma como nube bien definida, intacta, por encima de y directamente por encima de la zona de fondo. La nube puede descender entonces sin alteraciones por ejemplo por objetos colocados en la trayectoria de caída o por, por ejemplo corrientes de aire adicionales, suministradas desde fuera, en el dispositivo o la cámara de exposición formada por el mismo, siendo ventajoso para el caso no obstaculizado de la nube, que el diámetro de la nube (en perpendicular a la dirección de caída de la nube) sea claramente menor que el ancho interno de la cámara en la respectiva altura, en particular que la superficie de sección transversal de la cámara de exposición al menos en la mitad superior de la cámara sea más de 2 veces, preferiblemente 2,5 veces, de manera especialmente preferible más de 3 veces más grande que la superficie de sección transversal de la nube en la respectiva altura.

Un aspecto preferido adicional es que la nube debe tener espacio suficiente, para no quedarse estancada y con ello caer sin obstáculos. Esto puede garantizarse por ejemplo y en particular porque las paredes laterales de la cámara estén situadas separadas suficientemente entre sí.

Un aspecto preferido adicional es que la nube debe llegar como estructura integral a la proximidad de la zona de

fondo, para poder formar un vórtice intenso para la distribución espacial uniforme del aerosol en la cámara de exposición. Esto puede requerir que la altura de caída no sea demasiado grande, dado que de lo contrario la nube se habrá ensanchado demasiado y desintegrado en la proximidad de la zona de fondo. En el caso de que la altura de caída o la distancia de la salida de la unidad de nebulización con respecto a la zona de fondo sea demasiado reducida, igualmente tampoco puede formarse un vórtice suficientemente grande para extenderse por toda la zona de fondo.

En el dispositivo descrito en el presente documento, las partículas de aerosol liberadas tras abandonar el dispositivo de aerosolización ya solo están sujetas al efecto de la inercia y de la gravedad, es decir que no actúan fuerzas externas adicionales sobre la nube.

Esto y características correspondientes del dispositivo permiten en particular la generación de una nube bien definida con un fuerte "movimiento propio". Para ello son preferiblemente ventajosos los siguientes aspectos: el diámetro de la nube, el contenido en líquido de la nube y/o la geometría de la cámara de exposición, en particular su altura así como longitud/anchura. Estos parámetros conjuntamente determinan preferiblemente la velocidad de caída y la integridad estructural de la nube en la proximidad de la zona de fondo, que son ventajosas para la formación de un vórtice suficientemente intenso y con ello la distribución uniforme del aerosol como niebla en la cámara de exposición. Por consiguiente, la velocidad de caída media de la nube puede designarse preferiblemente como resultado de las propiedades estructurales del dispositivo. En particular, la velocidad de caída se vuelve preferiblemente cada vez menor cuanto más llena esté la cámara de exposición con niebla. Es decir, las altas velocidades de caída se obtienen preferiblemente solo al principio del proceso de exposición.

En particular, la nube (de aerosol) descrita en el presente documento puede estar definida porque tiene un contenido en líquido tan alto que es visible a la luz del día. A diferencia de la niebla, una nube está preferiblemente delimitada localmente, es decir está delimitada claramente de un entorno con un contenido en líquido menor. Por ello, una nube se mueve como un gas con mayor densidad en un gas con menor densidad, es decir una nube desarrolla debido a la gravitación un intenso movimiento propio y con ello una velocidad de caída claramente mayor que la que alcanzarían las gotas individuales, dado que las gotas en el interior de la nube están protegidas frente a la resistencia aerodinámica por las gotas externas y por consiguiente pueden caer más rápidamente ("efecto de sotavento", como también se mencionó anteriormente). Este efecto de nube es ventajoso para la invención presentada en el presente documento. Además, una nube que ya tiene una cierta velocidad inicial se frena según las leyes de la fricción, siendo responsable la nube como totalidad geométrica de la evolución del movimiento (no las gotas individuales).

Para la distribución uniforme del aerosol sobre la zona de fondo se prefiere y resulta ventajoso que no se deposite la nube delimitada estrechamente directamente sobre la zona de fondo mediante impacto inercial, sino que la nube se convierta en una niebla uniforme, que llena toda la cámara de exposición y que entonces mediante sedimentación natural humecta uniformemente la zona de fondo o el dispositivo de posicionamiento dispuesto en la misma con las muestras que se encuentran en el mismo. Una niebla es igualmente un aerosol líquido muy denso, que se diferencia de una nube en que una niebla está distribuida uniformemente y tiene una extensión grande, mientras que una nube está delimitada espacialmente, no está distribuida necesariamente de manera uniforme y tiene una transición marcada al aire pobre en líquido circundante. Una niebla se produce en el dispositivo por ejemplo y preferiblemente por el arremolinamiento natural de la nube, cuando choca con la zona de fondo y se desvía allí hacia todos los lados de manera uniforme, lo que conduce a la formación de vórtices o remolinos, que convierten la nube claramente definida en una niebla uniforme.

En particular, la niebla descrita en el presente documento puede describirse como un aerosol líquido muy extendido, distribuido uniformemente, cuyo contenido en líquido es tan alto que es visible a simple vista debido a la dispersión luminosa en las gotas. La niebla es espacialmente muy estable; a diferencia de una nube no desarrolla un movimiento propio intenso.

Además se prefiere y resulta ventajoso que los diversos elementos del dispositivo estén dimensionados de manera adecuada, en particular en relación entre sí. Por ejemplo, el dispositivo de aerosolización, en particular su salida, puede estar dispuesto aproximadamente de 5 cm a 50 cm, además de manera preferible aproximadamente de 7 cm a 30 cm y de manera especialmente preferible de aproximadamente 9 cm a 20 cm por encima de la zona de fondo o del dispositivo de posicionamiento y en particular de la LFG. Una longitud lateral vertical o altura de las paredes laterales es preferiblemente de aproximadamente 8 cm a 53 cm, de manera preferible de aproximadamente 10 cm a 33 cm y de manera especialmente preferible de aproximadamente 12 cm a 23 cm. Una longitud lateral horizontal preferida o anchura de la zona de fondo y/o de las paredes laterales asciende a aproximadamente de 5 cm a 100 cm (en particular en el caso de la utilización de varios nebulizadores, como se describe a continuación) y preferiblemente de aproximadamente 7 cm a 50 cm y de manera especialmente preferible de aproximadamente 8 cm a 25 cm. Las paredes laterales pueden ser igual de largas y comprender una zona de fondo y/o zona de tapa aproximadamente cuadrada o presentar anchuras diferentes, y por ejemplo comprender una zona de fondo y/o zona de tapa rectangular. En el caso de paredes laterales de diferente longitud, la otra longitud lateral horizontal preferida o profundidad de la zona de fondo y/o de las paredes laterales asciende a aproximadamente de 4 cm a 80 cm (en particular en el caso de la utilización de varios nebulizadores, como se describe a continuación) y de manera preferible a aproximadamente de 5 cm a 40 cm y de manera especialmente preferible a aproximadamente de 6 cm a

20 cm. La relación entre la longitud vertical (altura) de las paredes laterales y la longitud lateral horizontal (anchura; profundidad) asciende a aproximadamente de 1/1 a 2/1, y/o más preferiblemente a aproximadamente de 4/3 a 1,5/1.

Además puede ser especialmente preferible que el cociente entre la superficie de la zona de fondo y la extensión vertical de las paredes laterales (en cada caso medidas en cm^2 o cm) ascienda a entre 3 y 12, preferiblemente entre 4 y 9, de manera especialmente preferible entre 5 y 7,5 (expuesto en este caso sin unidades).

Igualmente, el cociente entre la superficie de la zona de fondo y la distancia de la entrada del dispositivo de aerosolización y la zona de fondo (en cada caso medidas en cm^2 o cm) asciende a entre 3 y 12, de manera especialmente preferible entre 4 y 9, de manera más especialmente preferible a entre 5 y 7,5 (expuesto en este caso sin unidades)

Un dimensionamiento de este tipo permite preferiblemente una formación de nube de aerosol ventajosa así como una humectación efectiva, uniforme y rápida de la muestra.

Para la formación de una niebla distribuida uniformemente en toda la cámara de exposición a partir del movimiento propio de la nube resulta ventajoso que la nube inicial (nube que se forma en el plazo de los primeros segundos de exposición, es decir en particular en el plazo de los primeros 10 segundos, preferiblemente en el plazo de los primeros 5 segundos y de manera especialmente preferible en el plazo de los primeros 3 segundos de la formación de la nube) choque como conjunto compacto con la zona de fondo, para tener suficiente impulso como para formar un vórtice, que se extiende uniformemente por toda la zona de fondo. Esto condiciona preferiblemente que la entrada del dispositivo de aerosolización esté posicionada no más de aproximadamente 50 cm, preferiblemente no más de 30 cm, de manera especialmente preferible no más de 20 cm por encima de la zona de fondo.

En particular se prefiere y resulta ventajoso que las distancias entre paredes laterales opuestas estén ajustadas de tal manera que los vórtices llenen uniformemente toda la superficie de la zona de fondo definida de ese modo. Esto limita la extensión horizontal máxima preferida de la cámara de exposición preferiblemente a como máximo aproximadamente 10 veces el diámetro de la nube inicial en el punto de entrada en la cámara de exposición. Este diámetro inicial de la nube puede ascender por ejemplo a aproximadamente 2 cm.

Según una forma de realización preferida, la geometría de la zona de tapa corresponde esencialmente a la zona de fondo y está dispuesta verticalmente con respecto a la misma (en la dirección de la gravedad por encima). Preferiblemente, la zona de tapa se extiende esencialmente a lo largo del o en la proximidad del plano imaginario formado por los extremos (superiores) de las paredes laterales y/o se delimita hacia fuera por las paredes laterales. Correspondientemente, la zona de fondo se extiende esencialmente a lo largo del o en la proximidad del plano imaginario formado por los extremos (inferiores) de las paredes laterales y/o se delimita hacia fuera por las paredes laterales.

Además se prefiere que la zona de fondo y/o la zona de tapa sea(n) esencialmente horizontal(es). Esto tiene preferiblemente un efecto ventajoso no sólo sobre la simplicidad de la construcción y la fabricación sino también sobre la funcionalidad descrita anteriormente y a continuación del dispositivo.

Mientras las paredes laterales, que tal como se ha descrito preferiblemente delimitan lateralmente las zonas de fondo y/o de tapa, están dispuestas de manera preferiblemente esencial en perpendicular, alternativamente están configuradas de manera preferiblemente esencial en forma piramidal y/o forma cónica, que se abre o se ensancha hacia abajo.

Las dimensiones y los parámetros del dispositivo comentados en el presente documento están configurados preferiblemente y adaptados entre sí preferiblemente de tal manera que se confieren y/o se posibilitan las funcionalidades descritas. Por ejemplo resulta ventajoso que el dispositivo de aerosolización genere un aerosol de tal manera que este forme una nube. Esta nube de aerosol formada por el dispositivo de aerosolización puede caer de manera preferiblemente esencial libremente, en particular para que el fuerte movimiento propio de la nube que resulta de ello conduzca al chocar con la zona de fondo a la formación de un vórtice muy marcado. Con este propósito resulta ventajoso que el dispositivo de aerosolización, la nube y/o el dispositivo esté(n) configurado(s) de tal manera que la superficie de sección transversal de la nube (en perpendicular al sentido de caída de la nube) sea claramente menor que la anchura interna de la cámara a la respectiva altura, en particular que la superficie de sección transversal de la cámara de exposición al menos en la mitad superior de la cámara ascienda a más de 2 veces, preferiblemente 2,5 veces, de manera especialmente preferible más de 3 veces más que la superficie de sección transversal de la nube a la respectiva altura.

La zona de tapa puede, excepto las respectivas secciones de extremo de las paredes laterales, estar configurada únicamente como abertura o rebaje. Sin embargo, se prefiere especialmente que la zona de tapa presente una pared de tapa. Esta puede proteger la zona, que está separada mediante las paredes laterales verticales del entorno, y también se denomina cámara de exposición, adicionalmente del entorno.

La pared de tapa puede estar configurada de manera que puede retirarse o estar dispuesta de manera que puede retirarse en las paredes laterales. Alternativamente, esta puede estar configurada de manera solidaria con las paredes laterales. De manera especialmente preferible, la pared de tapa también puede presentar un rebaje o una

abertura o presentar una zona que esté configurada de manera que puede retirarse o para su apertura. Esta zona retirable o esta abertura de la pared de tapa está configurada o dimensionada de manera especialmente preferible de tal manera que el dispositivo de aerosolización pueda introducir el aerosol mediante las mismas o a través de las mismas en la cámara de exposición verticalmente hacia abajo en la dirección de la zona de fondo. El dispositivo de aerosolización puede disponerse para ello verticalmente justo por encima de la zona de tapa, exactamente a la altura de la zona de tapa o verticalmente justo por debajo de la zona de tapa. A este respecto, la posición del dispositivo de aerosolización se determina preferiblemente mediante su salida de aerosol, preferiblemente mediante el sitio de la generación de aerosol, por ejemplo la membrana oscilante. El posicionamiento del dispositivo de aerosolización puede conducir a una formación de nube especialmente adecuada y ventajosa.

Además se prefiere especialmente que las paredes laterales sean al menos parcialmente transparentes. Por ejemplo, las paredes laterales pueden presentar vidrio y/o plástico, por ejemplo un policarbonato transparente, preferiblemente Makrolon, o estar compuestos por los mismos. Este último es particularmente ventajoso, dado que puede esterilizarse fácilmente con, por ejemplo, alcohol. Además, al usuario le puede resultar posible observar los fenómenos que tienen lugar dentro del dispositivo. En particular, de este modo puede ponerse al usuario en la situación de observar en qué medida una formación de nube y de vórtice y/o una humectación ha terminado o en qué medida ha avanzado. Esto sirve preferiblemente para el control de calidad y la optimización del modo de proceder.

Además, de este modo el dispositivo puede configurarse de manera relativamente ligera (de poco peso), por ejemplo el dispositivo puede estar configurado de tal manera que su peso total (por ejemplo sin dispositivo de posicionamiento) no ascienda a más de cinco kilogramos, preferiblemente no más de un kilogramo, por ejemplo aproximadamente 800 gramos (a este respecto el dispositivo de posicionamiento no comprende preferiblemente ninguna característica adicional relevante para el peso, como por ejemplo un dispositivo de calentamiento). Mediante una configuración ligera y además mediante el dimensionamiento adecuado descrito anteriormente puede utilizarse un dispositivo de este tipo en particular también para su uso en una cabina de flujo laminar o cámara de esterilización.

Preferiblemente, la pared de tapa presenta al menos uno de los materiales que presentan también las paredes laterales. Esto puede implementarse por ejemplo de manera especialmente sencilla desde el punto de vista de la técnica de fabricación. Además, esto conduce a una apariencia unitaria del dispositivo.

Preferiblemente el dispositivo y en particular sus componentes, por ejemplo las paredes laterales, pueden estar configurados estancos al aire o a los gases hacia fuera. Un dispositivo de este tipo es especialmente muy adecuado también para experimentos toxicológicos o para investigar sustancias toxicológicas. En particular, en una configuración de este tipo, los componentes (por ejemplo las paredes laterales) también pueden estar impermeabilizados de manera estanca al aire o a los gases de manera correspondiente entre sí, por ejemplo mediante el uso de materiales de sellado.

El dispositivo de aerosolización está configurado preferiblemente como nebulizador. Sin embargo, el dispositivo de aerosolización además puede presentar también varios nebulizadores, que estén dispuestos de manera adecuada entre sí. A este respecto, los nebulizadores pueden disponerse preferiblemente cerca o estrechamente unos junto a otros, en particular de modo que las respectivas nubes de aerosol generadas por los nebulizadores se fusionen ya poco tras la generación para dar una nube grande. Alternativa y/o adicionalmente, los nebulizadores del dispositivo de aerosolización pueden disponerse preferiblemente con tanta separación entre sí, que cada nebulizador genere una nube independiente, no fusionándose las nubes de aerosol individuales hasta el descenso y el arremolinamiento para dar una niebla, que permite una deposición de gotas uniforme. A este respecto es importante en particular la disposición espacial de los nebulizadores, que puede depender a su vez de la geometría de la cámara, de la superficie de sección transversal activa (diámetro) de la nube inicial y de la tasa de expulsión de líquido del nebulizador.

Los nebulizadores de membrana oscilante preferidos pueden presentar por ejemplo una membrana, que está alineada preferiblemente en paralelo con respecto a la horizontal. Un dispositivo de aerosolización configurado de esta manera puede garantizar en particular una formación de nube adecuada, tal como se describió anteriormente.

En particular, el dispositivo de aerosolización está adaptado preferiblemente a generar o liberar partículas de aerosol con un tamaño medio de entre aproximadamente 1 μm y 15 μm , preferiblemente entre aproximadamente 2 μm y 10 μm y de manera especialmente preferible entre aproximadamente 3 μm y 7 μm . También esto influye en una formación de nube adecuada y en el tiempo de sedimentación de la niebla preferiblemente de manera adicionalmente positiva. Las gotas demasiado grandes impactan directamente con la aproximación de la nube inicial en la zona de fondo. Dado que la nube inicial no está distribuida uniformemente a través de la zona de fondo, esto conduciría a una humectación no uniforme de la zona de fondo. Las gotas demasiado pequeñas no tienen suficiente masa para sedimentar eficazmente sobre la placa de fondo, lo que prolongaría el tiempo de sedimentación y con ello el tiempo de una exposición y reduciría la eficacia de deposición.

Preferiblemente, el dispositivo de aerosolización, en particular en una vista en planta vertical, está dispuesto de manera centrada por encima de la zona de fondo o del dispositivo de posicionamiento. A este respecto, el punto

central de la zona de fondo o del dispositivo de posicionamiento en una vista en planta vertical coincide de manera preferible aproximadamente con el punto central del dispositivo de aerosolización. Si el dispositivo de aerosolización comprende varios nebulizadores, estos están dispuestos a este respecto preferiblemente de manera esencialmente simétrica con respecto al punto central de la zona de fondo o del dispositivo de posicionamiento. Esto puede favorecer en particular que la formación de la nube tenga lugar de manera simétrica y uniforme y por tanto que la muestra se humecta de manera especialmente uniforme con la sustancia.

Según una forma de realización preferida adicional, el dispositivo presenta una fuente luminosa. Esta está adaptada o dispuesta preferiblemente para indicar a un usuario si la nube ya ha descendido completamente en la cámara de exposición. Por ejemplo, en el caso de la fuente luminosa puede tratarse de una fuente de láser, por ejemplo un "puntero láser". La fuente luminosa está dispuesta preferiblemente de tal manera que se emite un rayo de luz definido a la cámara. Preferiblemente se genera un rayo con un diámetro que es menor de 1 cm. Preferiblemente, la disposición es de tal manera que el rayo láser emitido discurre esencialmente en perpendicular a una dirección de visión de un usuario. De este modo puede protegerse al usuario por un lado de la radiación láser. Por otro lado, el usuario solo percibe el rayo láser como tal cuando se dispersa (por ejemplo en partículas finas en una nube o en una niebla). Por tanto, mediante una fuente luminosa de este tipo se proporciona una posibilidad sencilla y segura de observar si la nube o la niebla están todavía presentes o si el aerosol ya se ha depositado sobre la muestra. En otras palabras, un rayo de luz de este tipo es invisible para el operario del dispositivo (que mira por ejemplo desde "delante" al interior de la cámara), a no ser que la cámara contenga una nube suficientemente densa o una niebla suficientemente densa, en cuyas gotas la luz se dispersa en todas las direcciones, es decir también hacia delante. En cuanto el rayo de luz ya no es visible, la nube ha descendido completamente sobre la zona de fondo y puede considerarse que la humectación de la muestra ha terminado. Preferiblemente, una fuente luminosa de este tipo está dispuesta en una pared lateral de tal manera que el rayo discurre en perpendicular a través de la pared lateral, de manera especialmente preferible en una posición centrada horizontalmente de la pared lateral. Verticalmente se prefiere especialmente que la fuente luminosa esté dispuesta a una distancia de entre aproximadamente 5 y 8 cm por encima del dispositivo de posicionamiento. En general de este modo puede proporcionarse un control sencillo y de fácil manejo, sobre si la nube ha descendido en la cámara ya completamente sobre la zona de fondo y con ello la operación de humectación ha terminado, que es ventajoso en comparación con el control meramente visual.

Además, se prefiere que el dispositivo presente además una cámara de control, que esté separada por ejemplo mediante al menos una pared de la cámara de exposición de tal manera que el aerosol generado por el dispositivo de aerosolización no llega a la cámara de control. De este modo, además de las muestras que se humectan mediante el aerosol, pueden también preverse muestras que no experimentan una humectación de este tipo, pero que están expuestas a las mismas influencias. Tales muestras pueden utilizarse con fines de comparación o como controles en particular para muestras biológicas, para garantizar que la manipulación de las propias muestras biológicas no tiene ningún efecto biológico (no intencionado) sobre las muestras.

Según un aspecto adicional, la invención se refiere también a un procedimiento para humectar al menos una muestra con un aerosol. En particular, este procedimiento puede realizarse con un dispositivo tal como se describió anteriormente. Comprende además preferiblemente las etapas o funcionalidades descritas en relación con la discusión anterior del dispositivo.

El procedimiento comprende preferiblemente las etapas de proporcionar al menos una muestra, generar y proporcionar una nube de aerosol por encima, preferiblemente en perpendicular por encima, de la al menos una muestra y hacer descender la nube de aerosol en la dirección de la muestra.

Preferiblemente, la nube forma al aproximarse a la zona de fondo al menos un vórtice y se convierte en una niebla. Esta desciende entonces en la dirección de la muestra.

A este respecto, las partículas de aerosol se liberan mediante el dispositivo de aerosolización libre de flujo de aire con una cierta velocidad de salida (o velocidad inicial) preferiblemente en la dirección de la muestra o del dispositivo de posicionamiento.

La nube de aerosol desciende, preferiblemente de manera condicionada por la gravitación y debido a la velocidad de salida de la nube fuera del nebulizador. La nube cae por consiguiente preferiblemente de manera libre. A continuación, la nube se desvía preferiblemente en la zona de fondo, por ejemplo en la muestra y/o el dispositivo de posicionamiento. La desviación tiene lugar preferiblemente de manera uniforme lateralmente en todas las direcciones y entonces tiene lugar una nueva variación de dirección de la nube hacia arriba mediante la desviación en las paredes laterales. De este modo se producen vórtices o remolinos, preferiblemente uniformes, que conducen en particular a una distribución uniforme de la nube de aerosol y con ello a la formación de una niebla de aerosol, en particular en la parte inferior de la cámara de exposición. En particular, en el caso de una nebulización progresiva, el dispositivo se llena por consiguiente gradualmente de abajo arriba con niebla. Esta niebla es de manera condicionada por la gravitación lo más densa abajo o en la proximidad del fondo. A continuación, en particular tras terminar la nebulización, la niebla desciende sobre el dispositivo de posicionamiento y la al menos una muestra dispuesta sobre el mismo. Las muestras se humectan uniformemente, independientemente del sitio de su disposición sobre el dispositivo de posicionamiento. La duración desde el inicio de la nebulización hasta el fin de la humectación, en particular uniforme, asciende preferiblemente a menos de 12 min, preferiblemente menos de 6 min,

de manera especialmente preferible menos de 3 min.

Las muestras son, como se ha descrito al principio, células en cultivo, preferiblemente células epiteliales, que están dispuestas o se cultivan preferiblemente en la LFG. Su disposición tiene lugar en particular sobre una placa de microtitulación convencional. Sin embargo, igualmente puede tratarse también de otro material biológico, por ejemplo tejidos, bacterias o similares. También es posible una implementación de las muestras como muestras de material de trabajo.

5

Preferiblemente, el aerosol y con ello la nube o la niebla presenta una sustancia farmacéuticamente y/o toxicológicamente activa.

10

Preferiblemente, el aerosol presenta una sustancia líquida, que se transfiere mediante pipeta por ejemplo al dispositivo de aerosolización. La nube de aerosol generada es preferiblemente de tal manera, en particular tan densa (alto contenido en líquido), que son aplicables las leyes del movimiento de una nube, siendo aplicables preferiblemente los parámetros descritos anteriormente para las propiedades de la nube. Esto conduce en particular a que la nube descienda debido a su velocidad de salida desde el nebulizador y la fuerza gravitacional (es decir debido a la caída), al aproximarse a la zona de fondo forme vórtices, que convierten la nube en una niebla, que desciende entonces debido a la gravitación uniformemente sobre la zona de fondo y la muestra que se encuentra en la misma.

15

Al experto en la técnica le quedará claro que los aspectos descritos anteriormente, que se han descrito detalladamente en relación con el dispositivo según la invención, también se implementan en el procedimiento según la invención.

20

En el marco de esta descripción se dan a conocer adicionalmente los siguientes aspectos en relación con la invención:

1. Dispositivo (2) para humectar al menos una muestra por medio de un aerosol,

presentando el dispositivo (2)

paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d),

25

una zona de fondo (6), que está delimitada por las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d),

estando adaptada la zona de fondo (6) para alojar o para actuar conjuntamente con un dispositivo de posicionamiento (8) para posicionar la(s) muestra(s), que está(n) situada(s) por ejemplo en elevaciones (18),

una zona de tapa (10), que está opuesta verticalmente a la zona de fondo (6), y que está delimitada por las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d),

30

formando el dispositivo (2) una cámara de exposición (12),

un dispositivo de aerosolización (14) para generar un aerosol (16), que está dispuesto en la proximidad de la zona de tapa (10),

estando dispuesto el dispositivo de aerosolización (14) por encima de la zona de fondo (6), de tal manera que el dispositivo de aerosolización (14) cubre al menos parcialmente la zona de fondo (6) en una vista en planta vertical.

35

2. Dispositivo (2) para humectar al menos una muestra por medio de un aerosol,

presentando el dispositivo (2)

paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d),

una zona de fondo (6), que está delimitada por las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d),

40

estando adaptada la zona de fondo (6) para alojar o para actuar conjuntamente con un dispositivo de posicionamiento (8) para posicionar la muestra,

una zona de tapa (10), que está opuesta verticalmente a la zona de fondo (6), y que está delimitada por las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d),

formando el dispositivo (2) una cámara de exposición (12),

45

un dispositivo de aerosolización (14) para generar un aerosol (16), que está dispuesto preferiblemente en la proximidad de la zona de tapa (10),

estando configurados el dispositivo (2) y/o el dispositivo de aerosolización (14) para formar una nube de aerosol.

3. Dispositivo (2) para humectar al menos una muestra por medio de un aerosol, presentando el dispositivo (2) paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d), una zona de fondo (6), que está delimitada por las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d),
- 5 estando adaptada la zona de fondo (6) para alojar o para actuar conjuntamente con un dispositivo de posicionamiento (8) para posicionar la(s) muestra(s), que está(n) situada(s) por ejemplo en elevaciones (18), una zona de tapa (10), que está opuesta verticalmente a la zona de fondo (6), y que está delimitada por las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d), formando el dispositivo (2) una cámara de exposición (12),
- 10 un dispositivo de aerosolización (14) para generar un aerosol (16), que está dispuesto preferiblemente en la proximidad de la zona de tapa (10), estando configurado el dispositivo de aerosolización como dispositivo de aerosolización libre de flujo de aire.
4. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, no presentando el dispositivo ningún dispositivo de aerosolización, sino estando configurado para alojarlo o para actuar conjuntamente con el mismo.
- 15 5. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, estando dispuesto el dispositivo de aerosolización (14) por encima de la zona de fondo (6), de tal manera que el dispositivo de aerosolización (14) cubre al menos parcialmente la zona de fondo (6) en una vista en planta vertical.
6. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, siendo las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d) esencialmente verticales, y/o
- 20 siendo la zona de fondo (6) esencialmente horizontal, y/o estando delimitada lateralmente la zona de fondo (6) por las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d), y/o estando delimitada lateralmente la zona de tapa (10) por las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d).
7. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, estando adaptado el dispositivo de aerosolización (14) para liberar el aerosol en la dirección (R) de la zona de fondo (6).
- 25 8. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, estando dispuesto el dispositivo de aerosolización (14) en una vista en planta vertical dentro de la(s) o entre la(s) pared(es) lateral(es) (4) y presentando preferiblemente una distancia mínima adecuada con respecto a las paredes laterales, que asciende preferiblemente a al menos 3 cm.
9. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, presentando el aerosol un líquido y/o un sólido y comprendiendo preferiblemente partículas en suspensión líquidas y/o sólidas y un gas.
- 30 10. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, estando configurado el dispositivo (2) y/o el dispositivo de nebulización (14) para formar una nube.
11. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, estando configurado el dispositivo para hacerse funcionar sin flujo de aire externo, y en particular libre de flujo de aire.
- 35 12. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, comprendiendo el dispositivo de aerosolización al menos un nebulizador y presentando preferiblemente un nebulizador configurado como nebulizador libre de flujo de aire y presentando preferiblemente un nebulizador de membrana oscilante y siendo preferiblemente uno de este tipo.
13. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, estando orientado el dispositivo de aerosolización (14) de tal manera que la dirección de movimiento inicial de la nube forma con la vertical un ángulo de menos de 30° y estando alineada de manera preferiblemente esencial en paralelo a la vertical y presentando el dispositivo de aerosolización (14) preferiblemente una membrana perforada, que forma con la horizontal un ángulo de menos de 30° y que está alineada de manera preferiblemente esencial en paralelo con respecto a la horizontal.
- 40 14. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, estando dispuesto en una vista en planta vertical el dispositivo de aerosolización aproximadamente de manera centrada por encima de la zona de fondo o del dispositivo de posicionamiento.
- 45 15. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, estando configurado el dispositivo de tal manera que una nube generada inicialmente por el dispositivo de nebulización se crea de tal manera que la velocidad de caída media de la nube generada al inicio de la exposición es mayor de 1 cm/s, preferiblemente mayor de 3 cm/s, de manera

especialmente preferible mayor de 10 cm/s, siendo esta velocidad preferiblemente la velocidad de salida de la nube fuera del dispositivo de aerosolización.

- 5 16. Dispositivo (2) según una de las reivindicaciones anteriores, estando configurado el dispositivo de tal manera que la nube generada por el dispositivo de aerosolización se crea de tal manera que la nube puede caer sin obstáculos y por consiguiente se garantiza un transporte rápido del aerosol a la zona de fondo.
17. Dispositivo (2) según una de las reivindicaciones anteriores, estando dimensionada la cámara de exposición de tal manera que la superficie de sección transversal horizontal de la cámara de exposición en la mitad superior de la cámara es más de 2 veces, preferiblemente 2,5 veces, de manera especialmente preferible más de 3 veces más grande que la superficie de sección transversal de la nube.
- 10 18. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, con un dispositivo de posicionamiento (8) para el posicionamiento de una muestra.
19. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, estando configurado(s) el dispositivo y/o el dispositivo de posicionamiento para alojar o para humectar una muestra, preferiblemente células y de manera especialmente preferible células epiteliales, por ejemplo en elevaciones (18).
- 15 20. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, estando adaptado(s) el dispositivo y/o el dispositivo de posicionamiento de tal manera que la muestra puede disponerse como capa límite aire-líquido (LFG).
- 20 21. Dispositivo (2) según uno de los aspectos anteriores, presentando el dispositivo de posicionamiento elementos para medir y/o regular una temperatura, por ejemplo una calefacción eléctrica o un dispositivo de control térmico que se hace funcionar con ayuda de un circuito de agua, elementos para el abastecimiento de la muestra, por ejemplo con medio nutritivo, y/o elementos para medir el peso de una sustancia depositada sobre una o varias muestras, por ejemplo una o varias microbalanzas de cristal de cuarzo.
- 25 22. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, estando dispuesto el dispositivo de aerosolización, en particular su salida, verticalmente entre 5 cm y 50 cm por encima de la zona de fondo o del dispositivo de posicionamiento, preferiblemente entre 7 cm y 30 cm, de manera especialmente preferible entre 9 cm y 20 cm y en particular aproximadamente 16 cm.
23. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, estando dispuesto el dispositivo de aerosolización, preferiblemente la membrana oscilante de un nebulizador, verticalmente por encima de la zona de tapa, preferiblemente entre 0 cm y 10 cm, de manera especialmente preferible entre 3 cm y 7 cm y en particular aproximadamente 5 cm por encima de la misma.
- 30 24. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, estando dispuesto el dispositivo de aerosolización verticalmente por debajo de la zona de tapa, preferiblemente entre 0 cm y 10 cm, de manera especialmente preferible entre 3 cm y 7 cm y en particular aproximadamente 5 cm por debajo de la misma.
25. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, siendo las paredes laterales al menos parcialmente transparentes.
- 35 26. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, presentando las paredes laterales vidrio y/o un plástico, por ejemplo policarbonato y presentando de manera especialmente preferible al menos zonas de las paredes laterales un material de este tipo o consistiendo en un material de este tipo.
- 40 27. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, teniendo las paredes laterales una extensión vertical de entre 8 cm y 53 cm, preferiblemente entre 10 cm y 33 cm, de manera especialmente preferible entre 12 cm y 23 cm y en particular aproximadamente 19 cm.
28. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, presentando la zona de fondo una primera longitud lateral horizontal de entre 5 cm y 100 cm, preferiblemente entre 7 cm y 50 cm, de manera especialmente preferible entre 8 cm y 25 cm y una segunda longitud lateral horizontal de entre 4 cm y 80 cm, preferiblemente entre 5 y 40 cm, de manera especialmente preferible entre 6 cm y 20 cm.
- 45 29. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, estando configurada la zona de fondo exactamente para alojar un dispositivo de posicionamiento, que comprende una, dos, tres o cuatro placas de microtitulación.
30. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, estando configurado el dispositivo para la humectación uniforme de varias, preferiblemente de 6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536 muestras, o 2 x (6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536) o 3 x (6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536) o 4 x (6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536) muestras.
- 50 31. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, presentando la zona de tapa y/o el dispositivo en la zona de tapa una pared de tapa, que se extiende de manera preferiblemente esencial en horizontal.
32. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, estando dispuesta la pared de tapa de manera que puede

retirarse en las paredes laterales verticales o estando unida con las mismas, y/o presentando una abertura o un rebaje y/o presentando una zona que está configurada para abrirse.

- 5 33. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, estando configurada o dimensionada la zona retirable o la abertura de tal manera que el dispositivo puede limpiarse en su pared interna y la(s) muestra(s) puede(n) situarse sobre la zona de fondo.
34. Dispositivo según el aspecto 32 o 33, estando dispuesta una zona retirable adicional o una abertura esencialmente de manera centrada en la zona de tapa.
- 10 35. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, estando configurada o dimensionada la zona retirable adicional o la abertura de tal manera que el dispositivo de aerosolización puede introducir el aerosol a través de la misma en la cámara de exposición.
- 15 36. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, presentando la pared de tapa al menos uno de los materiales que presentan las paredes laterales.
37. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, ascendiendo la distancia vertical del dispositivo de aerosolización, en particular de su salida, con respecto a la muestra y preferiblemente con respecto a la capa límite aire-líquido representada mediante una muestra biológica a entre 5 cm y 50 cm, preferiblemente entre 7 cm y 30 cm y de manera especialmente preferible entre 9 cm y 20 cm, en particular aproximadamente 16 cm.
38. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, presentando el dispositivo exactamente un nebulizador.
39. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, presentando el dispositivo varios nebulizadores.
- 20 40. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, estando adaptado el dispositivo de aerosolización para generar y/o liberar partículas de aerosol con un diámetro aerodinámico medio de entre 1 μm y 15 μm , preferiblemente entre 2 μm y 10 μm , de manera especialmente preferible entre 3 μm y 7 μm .
- 25 41. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores y adicionalmente con una fuente de láser, que está configurada y posicionada para emitir un rayo láser esencialmente en paralelo con respecto a la horizontal y en perpendicular con respecto a la dirección de visión del operario a través de al menos una pared lateral, de modo que el rayo láser es visible exactamente para un usuario cuando una nube o una niebla se encuentra en la cámara de exposición.
42. Dispositivo según uno de los aspectos anteriores, presentando el dispositivo además una cámara de control, que está separada, preferiblemente mediante al menos una pared, de la cámara de exposición, de tal manera que el aerosol generado por el dispositivo de aerosolización no llega a la cámara de control.
- 30 43. Procedimiento para humectar al menos una muestra por medio de un aerosol, en particular con un dispositivo según uno de los aspectos anteriores, presentando el procedimiento las etapas de
proporcionar al menos una muestra,
generar una nube de aerosol (16) por encima, preferiblemente en perpendicular por encima, de la al menos una muestra en una posición, que cubre al menos parcialmente la zona de fondo (6) en una vista en planta vertical
y dejar descender la nube de aerosol en la dirección (R) de la muestra.
- 35 44. Procedimiento para humectar al menos una muestra por medio de un aerosol, en particular con un dispositivo según uno de los aspectos anteriores, presentando el procedimiento las etapas de
proporcionar al menos una muestra,
generar una nube de aerosol (16)
y dejar descender la nube de aerosol en la dirección (R) de la muestra.
- 40 45. Procedimiento para humectar al menos una muestra por medio de un aerosol, en particular con un dispositivo según uno de los aspectos anteriores, presentando el procedimiento las etapas de
proporcionar al menos una muestra,
generar un aerosol (16) por medio de un nebulizador libre de flujo de aire,
y dejar descender el aerosol en la dirección (R) de la muestra.
- 45 46. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 46, además con la etapa de conformar vórtices, que convierten la nube en una niebla, que llena uniformemente la cámara de exposición en una vista en planta vertical de la zona de fondo.

47. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 47, además con la etapa de dejar descender de manera condicionada por la gravitación la niebla.
48. Procedimiento según uno de los aspectos 45 a 48, comprendiendo la etapa de generar el aerosol generar una nube de aerosol.
- 5 49. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 49, teniendo lugar la etapa de generar el aerosol (16) o la etapa de generar la nube de aerosol verticalmente por encima de la al menos una muestra en una posición, que cubre al menos parcialmente la zona de fondo (6) en una vista en planta vertical.
50. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 50, además con la etapa de humectar uniformemente en el espacio la al menos una muestra.
- 10 51. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 51, además con la etapa de generar el aerosol (16) por encima de la al menos una muestra.
52. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 52, además con la etapa de formar remolinos en la nube de aerosol, preferiblemente mediante el choque de la nube con la muestra y/o con un dispositivo de posicionamiento (8) que proporciona la muestra.
- 15 53. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 53, además con la etapa de formar una niebla y dejar descender de manera condicionada por la gravitación la niebla sobre la al menos una muestra.
54. Procedimiento según uno de los aspectos 51 a 54, significando la etapa de humectar uniformemente que en el caso de usar un dispositivo de posicionamiento para más de una muestra, que tiene un tamaño de como máximo 5 cm², las muestras se cubren con aproximadamente la misma masa de sustancia, ascendiendo la variabilidad de las masas, en particular el nivel de confianza al 95%, alrededor del valor medio entre las muestras a menos del 40%, preferiblemente menos del 30%, de manera especialmente preferible menos del 20% y ascendiendo de manera muy especialmente preferible a menos del 10%.
- 20 55. Procedimiento según uno de los aspectos 51 a 55, además con la etapa de proporcionar una muestra sobre un dispositivo de posicionamiento, preferiblemente en la LFG.
- 25 56. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 56 y además con la etapa de proporcionar un dispositivo de aerosolización (14), preferiblemente dispositivo de nebulización libre de flujo de aire para generar el aerosol (16).
57. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 57, presentando el aerosol una sustancia farmacéuticamente activa o una sustancia tóxica, por ejemplo sustancias inorgánicas y/u orgánicas, péptidos y/o proteínas solubles en agua.
- 30 58. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 58, presentando el aerosol nanopartículas y/o partículas en suspensión que se producen de manera natural o que se generan intencionadamente de sustancias inorgánicas y/u orgánicas, por ejemplo partículas de negro de carbón, partículas metálicas y de óxido de metal, nanotubos de carbono, liposomas y/o partículas de gelatina.
- 35 59. Procedimiento según uno de los aspectos 44 a 59, consiguiéndose una humectación uniforme de la muestra en menos de 12 min, preferiblemente menos de 6 min, de manera especialmente preferible menos de 3 min.
60. Uso de un dispositivo según uno de los aspectos 1 a 42, para realizar un procedimiento según uno de los aspectos 44 a 59.

Las etapas de procedimiento tienen lugar preferiblemente, pero no necesariamente, en la secuencia descrita.

- 40 La presente invención, es decir el presente dispositivo según la invención y el procedimiento según la invención, posibilita una humectación o cobertura rápida, eficaz y uniforme de muestras, preferiblemente células en la capa límite aire-líquido (LFG) con un aerosol, en particular con aerosoles líquidos, además en particular con aerosoles líquidos con sustancias farmacéuticas. Mediante el transporte descrito de las sustancias en un aerosol por medio de, por ejemplo, convección en la nube, en particular sin generar o utilizar una corriente de aire externa en el o desde el dispositivo o sin impacto inercial o pulverización, pueden evitarse desventajas del estado de la técnica e implementarse ventajas. Así, en la presente invención puede conseguirse casi de manera constante sin un gran esfuerzo técnico una humedad relativa del aire de cerca del 100%, lo que puede conducir por ejemplo a buenas condiciones de cultivo para células, a una evaporación muy ralentizada o completamente impedida de las gotas y a una alta eficacia de deposición de gotas (entre el 70 y el 95% sobre la zona de fondo). Esto puede conseguirse en particular, al ser el contenido en agua en la nube tan alto que ya la evaporación de cantidades de líquido porcentualmente pequeñas (<5%) conduce a condiciones saturadas. Esto posibilita en particular prescindir en la presente invención de un sistema de control de la humedad complejo, caro y susceptible de fallos. Una ventaja adicional de la presente invención consiste en que no sea necesaria una homogeneización activa del aerosol. En los sistemas conocidos tiene que conseguirse un aerosol de este tipo por ejemplo activamente mediante mezclado por ejemplo mediante un ventilador. Esto no es necesario en este caso, dado que puede conseguirse una distribución
- 50

homogénea y uniforme aprovechando efectos físicos de la nube.

Además, por ejemplo la rápida duración de deposición de preferiblemente menos de doce minutos y hasta menos de tres minutos conduce a que la muestra no tenga que permanecer mucho tiempo en la cámara de exposición. Esto puede ser especialmente ventajoso en particular en el caso de sistemas biológicos, por ejemplo células, dado que estas reaccionan de manera muy sensible a variaciones en su entorno. Esta alta sensibilidad es, en particular en el caso de tiempos de exposición prolongados, el motivo del uso de una termostatación del sistema. La presente invención supera los sistemas conocidos en particular tanto en cuanto a la eficacia, exactitud de la dosis como distribución equitativa de las sustancias con al mismo tiempo una capacidad de manipulación claramente mejorada.

Además, se prefiere que el dispositivo pueda hacerse funcionar de manera estéril. Por ejemplo, el modo de construcción fácilmente accesible, y el número reducido de componentes constructivos así como el uso de materiales persistentes en alcohol permite una esterilización sencilla de todas las superficies expuestas a aerosol y a células. Además, el dispositivo es suficientemente compacto para que quepa en cabinas de flujo laminar habituales en el mercado. Esto es una ventaja con respecto a la mayoría de los sistemas conocidos.

En particular o resumiendo puede establecerse, especialmente en comparación con los sistemas hasta la fecha, que la presente invención posibilita ventajosamente un sistema libre de flujo de aire, es decir en particular sin aportes y evacuaciones de aire, con tiempos de exposición muy cortos (de menos de 3-12 min en lugar de varios días, u horas y al menos 30 min en el estado de la técnica) con un transporte de sustancia comparativamente alto (aproximadamente 0,5 μl de sustancia por cm^2 de muestra por minuto) a las muestras, lo que permite un alto caudal de muestra. Solo es necesaria una intervención reducida, si acaso, por ejemplo en cuanto al abastecimiento de CO_2 , del acondicionamiento térmico para una manipulación de las células fuera de la incubadora, etc. También se consiguen eficacias de deposición excepcionalmente altas (por encima del 70%, de manera preferible aproximadamente el 75-95% y más preferiblemente casi el 100% del aerosol alcanza la zona de fondo, que contiene el dispositivo de muestra con las muestras), que con una aplicación repetida presentan un alto grado de reproducibilidad con una desviación del 25%, preferiblemente del 20% y de manera especialmente preferible del 10%, con respecto a la dosis media (nivel de confianza del 95%), con una distribución equitativa al mismo tiempo alta del aerosol depositado sobre la(s) muestra(s). La variabilidad de la dosis alrededor del valor medio (nivel de confianza del 95%) en 6 insertos Transwell de una placa de microtitulación de 6 pocillos asciende a menos del 40%, preferiblemente menos del 30% y de manera especialmente preferible menos del 20%. También es posible trabajar de manera completamente estéril para un cultivo adicional o exposiciones repetidas. El sistema puede concebirse además de manera modular y en caso necesario complementarse de manera sencilla con componentes adicionales, por ejemplo con un dispositivo de calentamiento, una microbalanza (de cristal de cuarzo), rayo láser o similares. Una aplicabilidad especialmente buena para muestras biológicas se consigue en particular mediante el tiempo de exposición reducido y el estrés reducido debido al tipo suave de deposición de aerosol ("deposición de nube" lenta).

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá ahora mediante formas de realización a modo de ejemplo con respecto a los dibujos adjuntos. Muestran:

la figura 1 una primera forma de realización de un dispositivo para humectar al menos una muestra con aerosol,

la figura 2 una forma de realización adicional de un dispositivo para humectar un dispositivo de posicionamiento con hasta seis muestras con aerosol,

las figuras 3a-3c etapas de un procedimiento con un dispositivo para humectar un dispositivo de posicionamiento con hasta seis muestras con aerosol, y

la figura 4 el efecto antiinflamatorio en función de la dosis del inhibidor del proteasoma bortezomib sobre una línea celular pulmonar humana, no polarizada (A549) en la LFG, que se estimuló de manera inflamatoria con factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF}\alpha$).

Descripción detallada de las figuras

A continuación se describirán a modo de ejemplo un dispositivo preferido y un procedimiento preferido. La figura 1 muestra una primera forma de realización de un dispositivo 2 para humectar al menos una muestra con una sustancia. El dispositivo 2 presenta esencialmente paredes laterales verticales 4a, 4b, 4c y 4d. En la forma de realización representada, estas paredes laterales esencialmente verticales 4a, 4b, 4c y 4d forman ángulos esencialmente rectos entre sí. Aunque esto se prefiere, no es necesario. Alternativamente es posible que el dispositivo 2 presente otro número de paredes laterales esencialmente verticales 4a, 4b, 4c y 4d. Así, por ejemplo es concebible que estén previstas únicamente tres paredes laterales, que forman en cada caso un ángulo de aproximadamente 60° entre sí. Igualmente pueden estar previstas más de cuatro paredes laterales, por ejemplo 5, 6 etc. Igualmente es concebible que esté prevista solo una pared continua, por ejemplo en forma de un cilindro. Además, los ángulos entre las paredes laterales verticales 4a, 4b, 4c y 4d pueden ser diferentes. Finalmente, puede ser preferible que las paredes laterales no sean esencialmente verticales y por ejemplo formen una pirámide

truncada o un cono truncado, que preferiblemente se estrecha hacia arriba.

Además, el dispositivo 2 presenta una zona de fondo o plataforma esencialmente horizontal 6, que ofrece espacio para el posicionamiento de al menos una muestra. Esta está delimitada preferiblemente por las paredes laterales 4a, 4b, 4c y 4d o sus extremos inferiores. La zona de fondo o plataforma 6 representa una superficie de fondo funcionalizable. En una forma de realización, como se muestra en la figura 1, esta zona de fondo, excepto las zonas inferiores de las paredes laterales 4a, 4b, 4c y 4d no presenta ninguna sustancia ni ninguna materia (es decir toda la zona de fondo 6 puede estar implementada como zona rebajada o está configurada como abertura definida por las paredes laterales y delimitada en particular lateralmente). Alternativamente, la zona de fondo puede comprender una placa de fondo o elementos adicionales, no representados.

5 El dispositivo 2 comprende además una zona de tapa 10. Esta zona de tapa 10 está opuesta a la zona de fondo en este caso verticalmente. Además, la zona de tapa 10 está delimitada preferiblemente por las paredes laterales 4a, 4b, 4c y 4d. Igualmente como la zona de fondo 6, la zona de tapa 10, excepto las zonas superiores de las paredes laterales 4a, 4b, 4c y 4d, también puede no presentar ninguna materia o ninguna sustancia. En otras palabras, la zona de tapa 10 puede estar configurada por tanto como una zona rebajada o está configurada como abertura definida por las paredes laterales y delimitada en particular lateralmente. Se prefiere que la zona de tapa 10 no esté configurada completamente como zona rebajada. Así, la zona de tapa 10 también puede presentar material, por ejemplo una tapa. Sin embargo, en un caso de este tipo, la zona de tapa 10 está dotada de un rebaje o de una abertura, que está dispuesta preferiblemente en el centro de la zona de tapa 10, para conectar la unidad de nebulización. Esta abertura o este rebaje puede estar configurada además de manera que puede cerrarse.

20 Mediante las paredes laterales esencialmente verticales 4a, 4b, 4c y 4d así como mediante la zona de fondo 6 y la zona de tapa 10 se separa una zona espacial, que forma una cámara de exposición 12. Esta puede tener una superficie de base esencialmente cuadrada o rectangular. Pueden preferirse otras formas. Además, la forma de realización representada presenta un dispositivo de aerosolización y en este caso un dispositivo de nebulización 14 para generar una mezcla gaseosa de sustancias. Este dispositivo de aerosolización 14 está dispuesto en la proximidad de la zona de tapa 10. En otras palabras, el dispositivo de aerosolización 14 tiene aproximadamente la misma distancia con respecto a la zona de fondo 6 que la zona de tapa 10.

25 El dispositivo de nebulización 14 está adaptado para liberar aerosol en la dirección de la zona de fondo 6, como se describe más detalladamente a continuación. Además, el dispositivo de aerosolización 14 está dispuesto por encima de la zona de fondo 6, concretamente de tal manera que el dispositivo de aerosolización 14 cubre al menos parcialmente la zona de fondo 6 en una vista en planta vertical y está dispuesto preferiblemente de manera centrada con respecto a la misma.

30 La zona de fondo 6 está adaptada para alojar un dispositivo de posicionamiento a modo de placa 8 para posicionar la(s) muestra(s). Esto puede implementarse, por ejemplo, mediante una configuración y un dimensionamiento adecuados de la zona de fondo 6 (en la figura 2 se muestra una forma de realización preferida, que también muestra el dispositivo de posicionamiento a modo de placa 8 para hasta seis muestras, que están dispuestas en entalladuras o elevaciones 18). Estas elevaciones 18 pueden alojar las muestras y/o soportes para las muestras. A este respecto, el dispositivo o su zona de fondo 6 puede solaparse por encima del dispositivo de posicionamiento o colocarse sobre el dispositivo de posicionamiento. Alternativamente, la zona de fondo presenta un fondo, preferiblemente retirable, sobre el que puede disponerse el dispositivo de posicionamiento o que está configurado como dispositivo de posicionamiento.

35 El aerosol presenta partículas de aerosol sólidas y/o líquidas, preferiblemente líquidas. Se prefiere además de manera muy especial que el aerosol presente una sustancia farmacéutica o tóxica.

40 Normalmente, el dispositivo de aerosolización, en particular su salida a la cámara de exposición, está separado verticalmente a una distancia D del dispositivo de posicionamiento y en particular de las muestras (figura 2). Esta distancia D puede ascender por ejemplo a aproximadamente entre 5 cm y 50 cm, preferiblemente a aproximadamente entre 7 cm y 30 cm, de manera especialmente preferible a aproximadamente entre 9 cm y 20.

45 De manera adaptada a esto, las paredes laterales verticales 4a, 4b, 4c y 4d presentan normalmente una extensión vertical L (figura 1) de aproximadamente entre 8 cm y 53 cm, de manera especialmente preferible de aproximadamente entre 10 cm y 33 cm, y en particular de entre 12 cm y 23 cm.

50 La extensión horizontal H1 y H2 de las paredes laterales 4a, 4b, 4c y 4d y con ello también la longitud lateral de la zona de fondo 6 para posicionar el dispositivo de posicionamiento 8 pueden estar configuradas de tal manera que una primera longitud lateral horizontal H1 ascienda al intervalo de entre 5 cm y 100 cm, preferiblemente entre 7 cm y 50 cm, y de manera especialmente preferible entre 8 cm y 25 cm, y una segunda longitud lateral horizontal H2 ascienda a entre 4 cm y 80 cm, preferiblemente entre 5 cm y 40 cm, y de manera especialmente preferible entre 6 cm y 20 cm.

55 Normalmente, el dimensionamiento está configurado de tal manera que la zona de fondo 6 está configurada para alojar una, dos, tres o cuatro placas de microtitulación. Así, el dispositivo de posicionamiento 8, como se muestra en la figura 2, puede presentar en particular una, dos, tres o cuatro placas de microtitulación, y en particular estar

compuesto por una, dos, tres o cuatro placas de microtitulación. De manera especialmente preferible, el dispositivo 2 y en particular la distancia de las paredes laterales esencialmente verticales 4a, 4b, 4c y 4d están configurados de tal manera que puede disponerse exactamente un número entero de tales placas de microtitulación convencionales a ras dentro de las paredes laterales 4a, 4b, 4c y 4d.

- 5 Además, el dispositivo 2 y en particular el dimensionamiento y los dispositivos de posicionamiento que deben usarse 8 pueden estar configurados de tal manera que sean adecuados para la humectación de un gran número de muestras, preferiblemente como ya se ha descrito. En la figura 2 se muestra una configuración de este tipo, en la que el dispositivo está configurado para la humectación de como máximo 6 muestras.

10 Se prefiere especialmente que la muestra presente células y preferiblemente células epiteliales (por tanto el dispositivo 2 es adecuado de manera especialmente preferible para humectar estas células o células epiteliales). Además, se prefiere especialmente que el dispositivo de posicionamiento 8 esté adaptado de tal manera que las muestras, por ejemplo las células y preferiblemente las células epiteliales, formen una capa límite aire-líquido (LFG). Preferiblemente, un dispositivo de posicionamiento presenta cavidades, en las que pueden disponerse muestras celulares por medio de insertos, por ejemplo insertos Transwell, para el cultivo de LFG.

- 15 Según la representación, el dispositivo de aerosolización 14 está dispuesto en la proximidad de la zona de tapa 10. En otras palabras, el dispositivo de aerosolización 14 tiene por tanto aproximadamente la misma distancia con respecto a la sección de fondo 6 o con respecto al dispositivo de posicionamiento 8 que la zona de tapa 10.

20 A este respecto, el dispositivo de aerosolización 14 puede estar dispuesto por ejemplo justo por encima de la zona de tapa 10 o también justo por debajo de la zona de tapa 10 (por ejemplo con una distancia de entre 0 cm y 10 cm, preferiblemente entre 3 cm y 7 cm y en particular aproximadamente 5 cm por encima o por debajo).

Se prefiere especialmente que el dispositivo 2 presente exactamente un dispositivo de aerosolización 14. Sin embargo, la invención también puede implementarse igualmente con más de un dispositivo de aerosolización 14, por ejemplo con 2, 3, 4 o 5 dispositivos de aerosolización 14 (no representados).

25 Se prefiere especialmente que el dispositivo de aerosolización 14 presente un nebulizador de membrana oscilante y preferiblemente sea uno de este tipo. Normalmente, el dispositivo de aerosolización 14 presenta una membrana (oscilante) perforada, que está alineada al menos esencialmente en paralelo con respecto a la horizontal. Normalmente, el dispositivo de aerosolización 14 está adaptado para generar o liberar partículas de aerosol con un tamaño medio de entre 1 μm y 15 μm , preferiblemente entre 2 μm y 10 μm , de manera especialmente preferible entre 3 μm y 7 μm .

- 30 Además, se prefiere que el dispositivo de aerosolización 14, en particular en una vista en planta, esté dispuesto aproximadamente de manera centrada por encima de la zona de fondo 6 o del dispositivo de posicionamiento 8.

35 En particular, el posicionamiento del dispositivo de aerosolización 14 en la zona o en la proximidad de la zona de tapa 10 permite que el aerosol 16 se libere sin un flujo de aire adicional y pueda introducirse en la cámara de exposición. En otras palabras, la disposición exacta del dispositivo de aerosolización 14, concretamente de tal manera que el dispositivo de aerosolización 14 cubre al menos parcialmente la zona de fondo 6 o el dispositivo de posicionamiento a modo de placa 8 en una vista en planta vertical, permite que el aerosol 16 pueda abandonar el dispositivo de aerosolización 14 con una velocidad que es suficientemente grande para transportar la nube rápidamente y de manera cohesionada a la proximidad de la zona de fondo, pero no tan alta como para que los aerosoles impacten al aproximarse por primera vez a la zona de fondo directamente con la misma. En particular, las partículas de líquido liberadas pueden abandonar el dispositivo de aerosolización 14 con una velocidad media de entre aproximadamente 5 cm y 1000 cm/s, de manera preferible aproximadamente de 10 a 500 cm/s, de manera especialmente preferible de entre 30 y 130 cm/s. En particular se prefiere que las partículas de aerosol liberadas tras abandonar el dispositivo de aerosolización 14 solo estén sujetas todavía a la acción de la inercia y de la gravedad, es decir que no actúa ninguna fuerza externa adicional sobre la nube. Preferiblemente, las partículas de aerosol forman tras el abandono una nube de aerosol, tal como se describió al principio. Preferiblemente no es necesario un flujo de aire adicional.

40 El dispositivo está compuesto preferiblemente por 3 piezas (figura 1 o 2). Concretamente una placa de microtitulación (convencional) como dispositivo de posicionamiento, en el que se cultivan las muestras (células); un nebulizador de membrana oscilante para generar una nube de aerosol, preferiblemente de gotas; y una cámara de exposición, tal como se describió anteriormente.

55 Preferiblemente, la cámara de exposición paralelepípedica está diseñada en planta de tal manera que quepa exactamente una placa de microtitulación convencional (12,8 cm x 8,6 cm). La cámara tiene una altura de aproximadamente 16,0 cm y en su techo está colocado de manera centrada un nebulizador de membrana oscilante disponible comercialmente (altura por encima del techo de la cámara en este caso preferiblemente de aproximadamente 5 cm), que por medio de una membrana perforada oscilante transforma un líquido directamente en una nube de aerosol o de gotas densa. El nebulizador está dirigido hacia abajo, de modo que la nube se forma directamente por encima de la placa de microtitulación convencional. La cámara consiste en policarbonato transparente (Makrolon), que puede esterilizarse fácilmente con alcohol. Todo el sistema es muy compacto, con un

peso total de aproximadamente 0,8 kg.

Haciendo referencia a las figuras 3a-3c, a continuación se explica a modo de ejemplo también un procedimiento para humectar al menos una muestra con un aerosol, en particular por medio de un dispositivo 2 tal como se describió anteriormente.

5 El procedimiento, en particular la exposición celular de células epiteliales en la LFG, tal como se ha explicado, puede dividirse en tres fases, concretamente (1) generar una nube de aerosol, preferiblemente mediante la nebulización de un líquido y "caída libre" de la nube generada; (2) formar una niebla y homogeneización (distribución equitativa) de la nube en la cámara de exposición mediante la formación de vórtice; y (3) hacer descender la niebla de aerosol sobre las células. A este respecto, la figura 3a corresponde a la fase (1), la figura 3b a la fase (2) y la figura 3c es atribuible a la fase (3).

10 Según la fase 1 en primer lugar se suministra una sustancia, por ejemplo farmacéutica o tóxica, al dispositivo de aerosolización 14, por ejemplo mediante transferencia mediante pipeta (normalmente de manera aproximada 200 µl). El dispositivo de aerosolización se activa y genera una nube de aerosol, preferiblemente de gotas. La nube puede tener una velocidad inicial y es en particular tan densa, que son aplicables las leyes del movimiento de una nube, lo que conduce en particular a una caída "libre" rápida de la nube (gravitación) y con ello a un transporte convectivo rápido de la sustancia o del principio activo a las células.

15 En la fase 2, tras haber llegado al suelo, la nube se desvía A de manera uniforme lateralmente en todas las direcciones, con lo que se forman vórtices simétricos W, que conducen a una distribución uniforme horizontal de la nube y con ello a la formación de una niebla (de gotas) N en la zona inferior de la cámara. En el caso de una actividad de nebulización adicional, la niebla llena progresivamente la cámara de abajo arriba, siendo la niebla lo más densa debido a la gravitación siempre en la proximidad del fondo.

20 Finalmente, en la 3ª fase, tras finalizar la nebulización desciende la niebla, como se indica mediante las flechas S en la figura 3c, debido a la gravitación en aproximadamente 3 min y menos sobre la(s) muestra(s) que se encuentran en el fondo, que está(n) preferiblemente en una placa de microtitulación convencional como células de LFG cultivadas en la misma, que de ese modo se humecta(n) uniformemente. Durante la formación de una niebla N de este tipo, la concentración de partículas cerca de la zona de fondo 6 o cerca del dispositivo de posicionamiento 8 es generalmente más alta que más alejado de los mismos (esto se indica mediante el rayado cada vez más oscuro en la figura 3c).

25 De este modo puede conseguirse en particular un recubrimiento rápido, altamente eficaz y horizontalmente uniforme de células en la capa límite aire-líquido (LFG). La manipulación del dispositivo no requiere ningún conocimiento especializado sobre física de aerosoles o de nubes, y puede manejarse y limpiarse fácilmente así como es menos susceptible de errores y de averías.

30 Además, también pueden utilizarse naturalmente elementos adicionales, tal como se describió anteriormente, en particular en relación con las figuras 1 y 2, en el procedimiento descrito ahora. Además, el procedimiento se realiza preferiblemente con el dispositivo 2 descrito.

35 En general, los parámetros de tamaño y densidad de la nube, así como las dimensiones exactas de las paredes laterales verticales 4a, 4b, 4c y 4d, de la zona de fondo 6 o del dispositivo de posicionamiento 8, así como la distancia D del dispositivo de aerosolización 14 con respecto al dispositivo de posicionamiento 8, la extensión vertical L de las paredes laterales 4a, 4b, 4c y 4d, contribuyen preferiblemente a garantizar o mejorar una humectación rápida y uniforme de la muestra con la sustancia.

40 El dispositivo según la invención o el procedimiento según la invención permiten en particular la generación sencilla y fiable de una película de líquido de manera preferible de aproximadamente 15 – 100 µm de grosor uniforme sobre superficies planas (y estructuradas). Con ello puede emplearse potencialmente no sólo para cultivos celulares de LFG, sino en general también para la generación de capas uniformes de grosor micrométrico sobre superficies horizontales.

45 A este respecto, resulta ventajosa en particular la homogeneización intrínseca o inherente de las humectaciones, que puede ocurrir por ejemplo sin medios adicionales, por ejemplo generar un campo eléctrico o un flujo de aire o sistema de mezclado adicional. Con el procedimiento se consigue en particular una distribución uniforme de las partículas de aerosol sobre las células. Esto se consigue en particular mediante la utilización de efectos físicos de la nube, que se favorecen mediante un diseño óptimo en cuanto a los siguientes parámetros: (1) dimensión geométrica de la cámara de exposición; (2) posicionamiento del nebulizador; (3) emisión de sustancias o de líquido desde el nebulizador por unidad de tiempo (tasa de salida) así como (4) un diámetro adecuado y una velocidad inicial adecuada de la nube de aerosol generada por el nebulizador.

Resultados de pruebas a modo de ejemplo

55 Los experimentos realizados con el dispositivo 2, en particular con uno tal como el descrito anteriormente, han dado como resultado los siguientes parámetros:

En el caso de usar el dispositivo 2 se consigue un alto factor de deposición de más de 0,8 o más del 80%. En otras palabras se deposita más del 80% de un líquido utilizado o de un aerosol sobre la placa de fondo (dado el caso con el dispositivo de posicionamiento 8). Esto se estableció con la nebulización de una disolución de fluoresceína como sustituto de un principio activo farmacéutico. Esto se dedujo a partir de datos para al menos 6 muestras con una superficie de en cada caso aproximadamente $4,5 \text{ cm}^2$, que se distribuyeron en al menos 6 puntos diferentes por la placa de fondo, y se convirtieron a la superficie total de la placa de fondo (125 cm^2).

Además, la dosis total aplicada es muy reproducible. En el caso de una nebulización repetida de $200 \mu\text{l}$ de disolución de fluoresceína se midieron desviaciones de como máximo aproximadamente $\pm 10\%$ (nivel de confianza del 95%) con respecto a la dosis total depositada de media sobre las 6 muestras.

Además se midió una distribución uniforme del principio activo por los diferentes pocillos (con un inserto Transwell de 6 pocillos) de una placa de microtitulación. La desviación de la dosis en pocillos individuales con respecto a la dosis media en todos los pocillos era en particular menor de $\pm 20\%$ (nivel de confianza del 95%).

Además se midieron tasas de deposición de principio activo de hasta $0,5 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{min}$ (a este respecto se trata del volumen del principio activo (sustancia) por superficie cubierta de célula por tiempo). Además, en el caso del uso del dispositivo según la invención y del procedimiento según la invención no pudo establecerse ningún efecto negativo sobre muestras biológicas debido a la manipulación durante la exposición). En particular, células de una línea celular pulmonar humana (A549), a las que se les aplicó durante el uso del dispositivo según la invención una solución salina fisiológica (no tóxica), no mostraron ninguna reducción de la viabilidad (WST-1) o un inicio de necrosis (LDH). Esto es una ventaja para la utilización del procedimiento con muestras biológicas.

Además se mostró que las células A549 en el dispositivo 2 no sólo son viables, sino que también pueden usarse para la investigación sistemática de la eficacia de nuevos principios activos (examen farmacológico). Si se usa una línea celular pulmonar no polarizada (en este caso: A549), es decir células, que sin embargo no se organizan de distinta manera en el lado de aire que en el lado de líquido, tiene que esperarse que la respuesta biológica de las células en la LFG (en el dispositivo 2) sea exactamente como en las condiciones de cultivo sumergidas, en las que el principio activo se transfiere mediante pipeta al medio. Si por el contrario se usan células epiteliales pulmonares polarizadas (por ejemplo células primarias), puede contarse con claras diferencias en la respuesta biológica. Tras la estimulación de células A549 con el factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF}\alpha$), la interleucina 8 (IL-8) está inducida como marcador inflamatorio en relación con el valor basal (células no estimuladas) aproximadamente 7 veces (corresponde al valor 1 en la figura 4). El efecto inflamatorio puede reducirse mediante la aplicación de un principio activo antiinflamatorio (en este caso bortezomib; un inhibidor del proteasoma) en función de la dosis en hasta un factor de 2. A este respecto, se muestra que la curva dosis-efecto tras la administración del principio activo en forma aerosolizada con el dispositivo 2 es idéntica a la curva de referencia, que se elaboró mediante pipeteo del principio activo directamente sobre las células. Esto muestra a modo de ejemplo que con el dispositivo 2 pueden aplicarse principios activos aerosolizados con una dosis exacta y sin pérdida de bioactividad (por ejemplo mediante tensiones de cizalladura durante la nebulización) sobre células pulmonares humanas en la LFG. Con ello, el dispositivo 2 es adecuado para el examen sistemático de sustancias en cuanto a su potencial como principio activo en forma aerosolizada.

La figura 4 muestra el efecto antiinflamatorio en función de la dosis del inhibidor del proteasoma bortezomib sobre una línea celular pulmonar humana, no polarizada (A549) en la LFG, que se estimuló inflamatoriamente con factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF}\alpha$). A este respecto, la curva dosis-efecto elaborada con el dispositivo 2 (rojo, ALI) no se diferencia de la curva de referencia (azul, SUB), que se midió mediante el pipeteo del principio activo sobre las células cultivadas de manera sumergida. Con ello se valida el dispositivo 2 como herramienta para el examen cuantitativo de principios activos para principios activos líquidos aerosolizados.

La invención comprende igualmente las expresiones, características, valores numéricos o zonas, etc. precisos o exactos, cuando se hayan mencionado anteriormente o a continuación estas expresiones, características, valores numéricos o zonas en relación con expresiones como por ejemplo "aproximadamente, alrededor de, esencialmente, en general, al menos", etc. (es decir "aproximadamente 3" debe comprender igualmente "3" o "de manera esencialmente radial" debe comprender también "radialmente" (y viceversa)). La expresión "o" significa además "y/o".

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (2) para humectar al menos una muestra por medio de un aerosol, presentando el dispositivo (2) paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d),
una zona de fondo (6), que está delimitada por las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d),
5 estando adaptada la zona de fondo (6) para alojar o para actuar conjuntamente con un dispositivo de posicionamiento (8) para posicionar la muestra,
una zona de tapa (10), que está opuesta verticalmente a la zona de fondo (6), y que está delimitada por las paredes laterales (4a, 4b, 4c, 4d)
formando el dispositivo (2) una cámara de exposición (12),
10 un dispositivo de aerosolización (14) para generar un aerosol (16), que está dispuesto en la proximidad de la zona de tapa (10),
estando dispuesto el dispositivo de aerosolización (14) por encima de la zona de fondo (6), de tal manera que el dispositivo de aerosolización (14) cubre al menos parcialmente la zona de fondo (6) en una vista en planta vertical
15 estando configurado el dispositivo (2) y/o el dispositivo de aerosolización (14) para formar una nube, y presentando la nube un volumen de partículas de aerosol de al menos el 10⁻⁴%,
estando el dispositivo (2) caracterizado porque el dispositivo está configurado para hacerse funcionar sin flujo de aire externo a o desde el dispositivo (2).
- 20 2. Dispositivo (2) según la reivindicación 1, presentando el dispositivo de aerosolización al menos un nebulizador.
3. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, estando orientado el dispositivo de aerosolización (14) de tal manera que la dirección de movimiento inicial de la nube forma con la vertical un ángulo de menos de 30° y está de manera preferiblemente esencial en paralelo a la vertical.
- 25 4. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, estando dispuesto en una vista en planta vertical el dispositivo de aerosolización aproximadamente de manera centrada por encima de la zona de fondo o del dispositivo de posicionamiento.
5. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, estando configurado el dispositivo de tal manera que una nube generada inicialmente por el dispositivo de aerosolización se obtiene de tal manera que la velocidad de caída media de la nube generada al inicio de la exposición es mayor de 1 cm/s, preferiblemente mayor de 3 cm/s, de manera especialmente preferible mayor de 10 cm/s.
- 30 6. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, estando configurado el dispositivo de tal manera que la nube generada por el dispositivo de aerosolización se obtiene de tal manera que la nube puede caer sin obstáculos y por consiguiente se garantiza un transporte rápido del aerosol a la zona de fondo.
- 35 7. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, estando dimensionada la cámara de exposición de tal manera que la superficie de sección transversal horizontal de la cámara de exposición en la mitad superior de la cámara es más de 2 veces, preferiblemente 2,5 veces, de manera especialmente preferible más de 3 veces más grande que la superficie de sección transversal de la nube generada inicialmente.
8. Dispositivo (2) según una de las reivindicaciones anteriores, con un dispositivo de posicionamiento (8) para el posicionamiento de una muestra.
- 40 9. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, estando configurado(s) el dispositivo y/o el dispositivo de posicionamiento para alojar o para humectar una muestra.
10. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, presentando la muestra material biológico y/o muestras de material de trabajo.
- 45 11. Dispositivo (2) según una de las reivindicaciones anteriores, presentando el dispositivo de posicionamiento elementos para medir y/o regular una temperatura, por ejemplo una calefacción eléctrica o un dispositivo de control térmico que se hace funcionar con ayuda de un circuito de agua, elementos para el abastecimiento de la muestra, por ejemplo con medio nutritivo, y/o elementos para medir el peso de una sustancia depositada sobre una o varias muestras, por ejemplo una o varias microbalanzas de cristal de cuarzo.

12. Procedimiento para humectar al menos una muestra por medio de un aerosol por medio de un dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, presentando el procedimiento las etapas de:
- proporcionar al menos una muestra,
- 5 generar una nube (16) por encima de la al menos una muestra en una posición, que cubre al menos parcialmente la zona de fondo (6) en una vista en planta vertical y
- dejar descender la nube en la dirección (R) de la muestra
- presentando la nube un volumen de partículas de aerosol de al menos el 10⁻⁴%.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, además con la etapa de conformar vórtices, que convierten la nube en una niebla, que llena uniformemente la cámara de exposición en la dirección horizontal (H₁-H₂).
- 10 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 13, además con la etapa de dejar descender de manera condicionada por la gravitación la niebla.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 14, además con la etapa de formar remolinos en la nube de aerosol, preferiblemente mediante el choque de la nube con la zona de fondo y/o sobre un dispositivo de posicionamiento (8) que proporciona la muestra.
- 15 16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 15, además con la etapa de formar una niebla y dejar descender de manera condicionada por la gravitación la niebla sobre al menos una muestra.
17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 16 y además con la etapa de proporcionar un dispositivo de aerosolización (14), preferiblemente un dispositivo de nebulización libre de flujo de aire, para generar el aerosol (16).
- 20 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 17, además con la etapa de humectar uniformemente en el espacio la al menos una muestra.
19. Uso de un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 11, para realizar un procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 18.

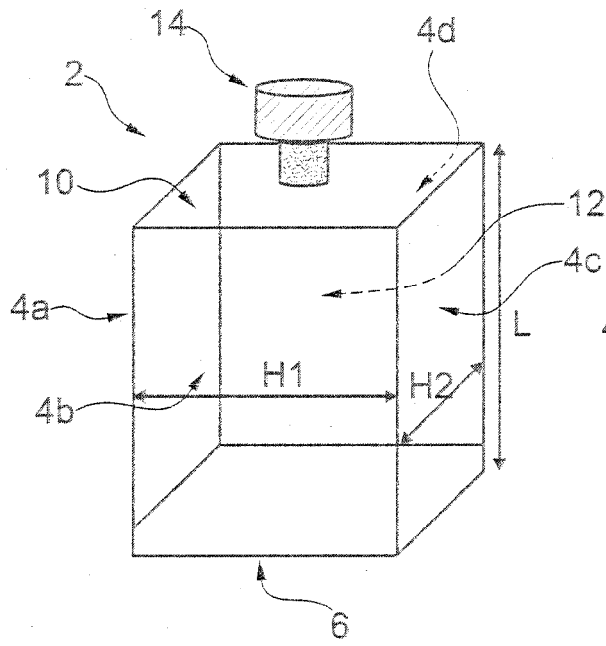


Fig. 1

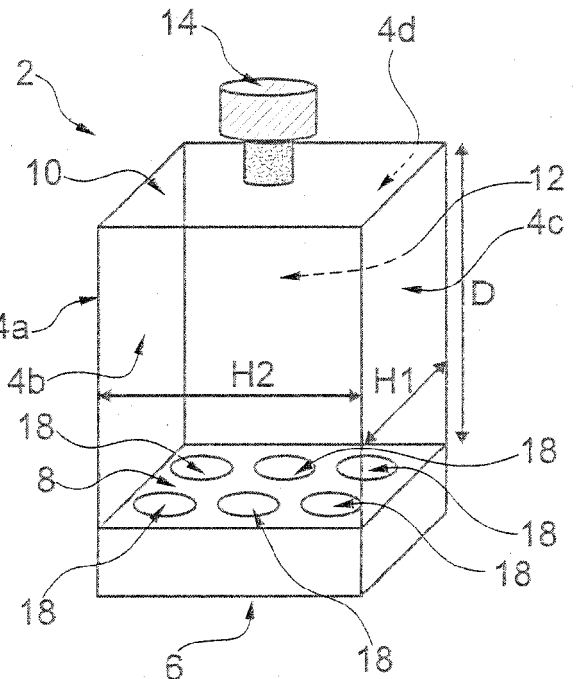


Fig. 2

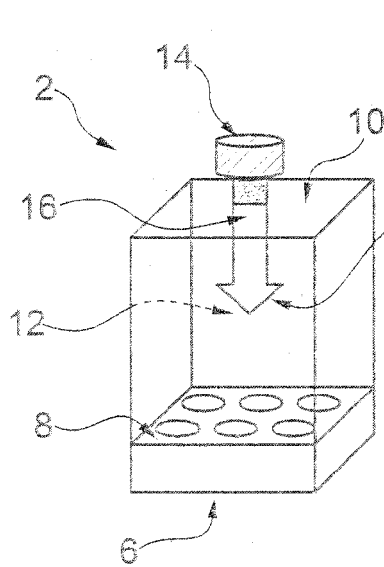


Fig. 3a

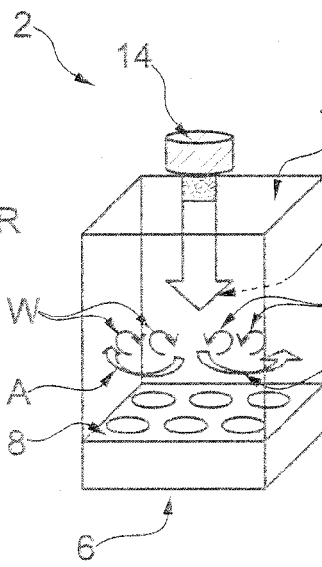


Fig. 3b

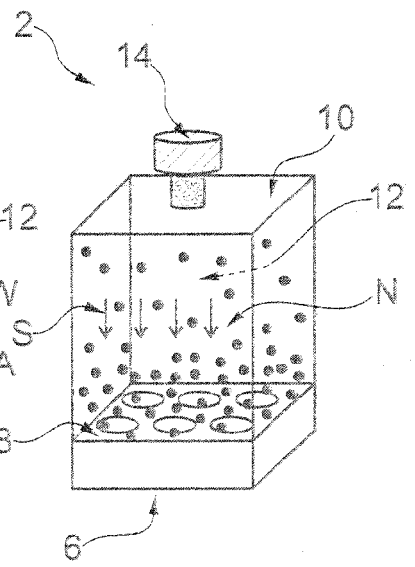


Fig. 3c

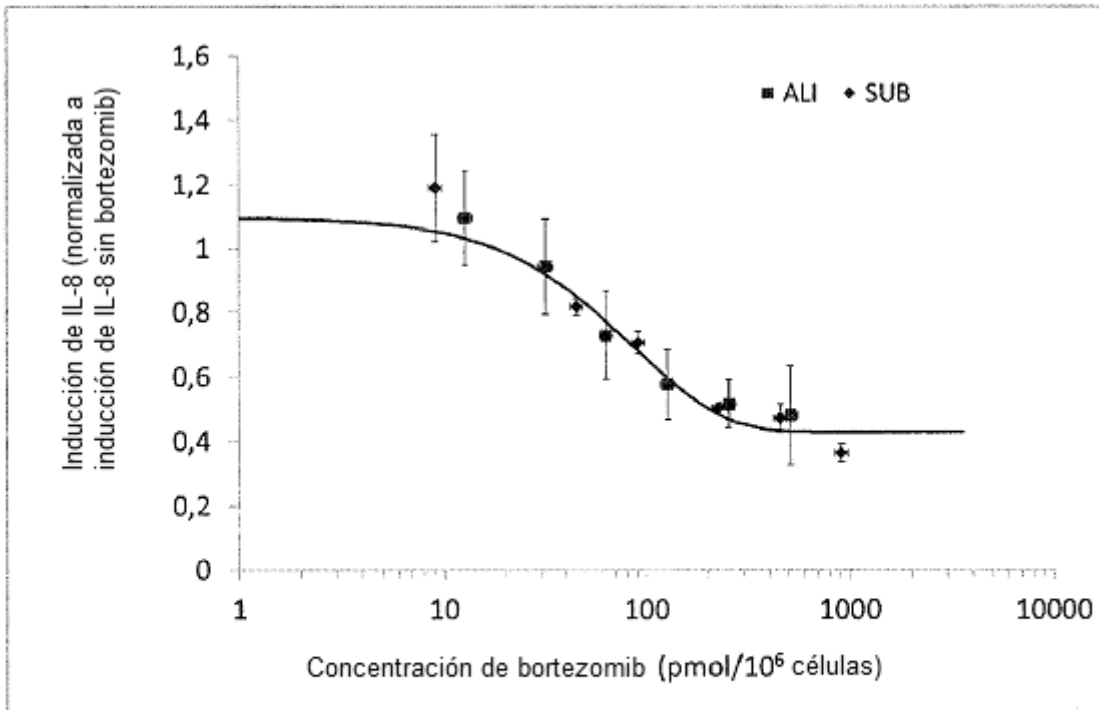


Figura 4