

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 980**

51 Int. Cl.:

G01N 21/03 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2012 PCT/IB2012/055981**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13061312**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2012 E 12799610 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2771669**

54 Título: **Método y dispositivo para el análisis óptico de partículas a bajas temperaturas**

30 Prioridad:

28.10.2011 IT TO20110990

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

23.11.2018

73 Titular/es:

**MENARINI SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)
Via G. di Vittorio, 21 B/3
40013 Castel Maggiore (BO), IT**

72 Inventor/es:

**MEDORO, GIANNI;
CALANCA, ALEX y
MANARESI, NICOLÒ**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 690 980 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y dispositivo para el análisis óptico de partículas a bajas temperaturas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a métodos y dispositivos para la manipulación de partículas en suspensión en un fluido, por ejemplo, que están contenidas en soluciones conductoras o sumamente conductoras, cuando el análisis óptico de las partículas manipuladas se ha de llevar a cabo a unas temperaturas por debajo de la temperatura ambiente. La invención se puede aplicar principalmente en la puesta en práctica de protocolos biológicos sobre células vivas.

Estado de la técnica

10 La solicitud de patente PCT/WO 00/69565, a nombre de G. Medoro, describe un dispositivo y un método para la manipulación de partículas por medio del uso de jaulas de potencial de dielectroforesis cerradas. La fuerza que se usa para mantener las partículas en suspensión o para mover las mismas en el interior de la microcámara disipa, por efecto Joule, una potencia que es proporcional al cuadrado de la amplitud de las tensiones que se aplican y crece de forma lineal con el aumento en la conductividad eléctrica del líquido en suspensión, dando lugar a un aumento no controlado en la temperatura en el interior de la microcámara. Las operaciones de manipulación se pueden controlar de forma individual por medio de la programación de unos elementos de memoria y circuitos que están asociados con cada elemento de una agrupación de electrodos que está integrada en el mismo sustrato; dichos circuitos contribuyen al aumento de temperatura, disipando potencia en el sustrato en contacto directo con el líquido en suspensión. Esto da como resultado una limitación importante debido a la variación en la expresión génica o a unos niveles altos de estrés o a la muerte de las partículas biológicas que se encuentran presentes en la muestra - para soluciones con una conductividad eléctrica alta, limitando la aplicación de estos métodos y dispositivos al uso de perlas o células no vivas. El documento WO 02/41999 divulga una placa de micropocillos que comprende una agrupación de pocillos (véase la figura 2) que están cubiertos por una película transparente. Antes del análisis óptico, la placa se coloca en un dispositivo de eliminación de condensación (véanse las figuras 4 - 5) que expulsa aire caliente por encima de la parte de arriba de la película y enfría la parte de debajo de la placa. A continuación la placa se saca del eliminador de condensación y se inserta en una unidad de formación de imágenes (véase de la página 5, línea 32 a la página 6, línea 2). El tiempo de observación es limitado, debido a que la placa tiende a adaptarse a la temperatura ambiente. Una función de eliminación de condensación mientras se lleva a cabo el análisis óptico no es prevista por el documento WO 02/41999. Asimismo, el documento US 2007/0015298 y el documento US2005/0009101 describen unos dispositivos microfluídicos para la formación óptica de imágenes. Las limitaciones de la técnica conocida se superan por medio de la solicitud de patente EP1945368 a nombre del mismo solicitante de la presente invención, que permite la manipulación de partículas biológicas por medio de la técnica que se describe en el documento PCT/WO 00/69565 (o por medio de otras técnicas que generan calor) preservando la vitalidad y las funciones biológicas de las células con independencia de las fuerzas usadas y / o la conductividad del líquido en suspensión, permitiendo por lo tanto la manipulación de células vivas.

35

No obstante, numerosas aplicaciones requieren que el líquido en suspensión y / o la totalidad del interior de la microcámara se mantenga, durante el procedimiento de manipulación, a unas temperaturas muy por debajo de la temperatura ambiente, por ejemplo, a unas temperaturas por debajo de 10 °C y, más frecuentemente, entre 3 y 5 °C, por ejemplo, 4 °C.

40 A tales bajas temperaturas, la humedad ambiente se condensa sobre la superficie exterior de la cubierta de la microcámara, que se realiza de un material transparente con el fin de permitir la observación y el análisis óptico de las células en suspensión, o bien por medio de dispositivos o sensores en el exterior de la microcámara, por ejemplo, un microscopio óptico, o bien por medio de sensores ópticos en el interior de la microcámara, que están integrados en el sustrato, los cuales, no obstante, requieren una iluminación externa adecuada con el fin de funcionar correctamente.

45

La presencia de humedad condensada sobre la cubierta de la microcámara da lugar tanto a un emborronamiento de la imagen que se puede adquirir del exterior como a una alteración en el paso de la luz externa, evitando un desempeño correcto de los protocolos de análisis, a menos que se dependa por completo de sensores internos no ópticos, por ejemplo, sensores impedanciométricos, pero esto no siempre es posible o conveniente.

Objeto de la invención

50 La presente invención se refiere a un método y dispositivo para llevar a cabo el análisis óptico de unas partículas que están contenidas en suspensión en un fluido, por lo general un líquido, que está dispuesto en el interior de un dispositivo microfluídico que lo mantiene a una temperatura significativamente más baja que la temperatura ambiente y tal como para desencadenar fenómenos de condensación sobre la superficie exterior del dispositivo

- microfluídico. Por lo general, el dispositivo microfluídico sirve para llevar a cabo la manipulación y / o el control de la posición de las partículas, por ejemplo, por medio de campos de fuerza eléctrica en soluciones eléctricamente conductoras y, más en general, por medio de cualquier otro sistema, en condiciones que requieren de forma simultánea una temperatura operativa relativamente baja y un desempeño de un análisis óptico de la posición y / o la apariencia de las partículas manipuladas, o para la detección de los parámetros morfológicos o para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Los campos de fuerza pueden ser de dielectroforesis (positiva o negativa), de magnetoforesis, de electroforesis, electrohidrodinámicos o electrohumectación sobre dieléctrico, o combinaciones de estos fenómenos, caracterizados por un conjunto de puntos de equilibrio estable para las partículas. También se pueden usar pinzas ópticas.
- 5
- 10 El aspecto principal de la invención se refiere a la prevención de la condensación de humedad sobre la superficie exterior de la cubierta de un dispositivo microfluídico que opera con una temperatura interna relativamente baja o bien mediante el aumento en la temperatura de la superficie exterior de la cubierta por encima de la temperatura de condensación (el punto de rocío), o bien mediante la bajada de la temperatura y / o la humedad ambiente en las proximidades de la cubierta del dispositivo microfluídico, con el fin de llevar la temperatura de condensación (el punto de rocío) por debajo de la temperatura operativa interna del dispositivo microfluídico.
- 15

Para dicho fin, el sistema se puede beneficiar del uso de uno o más sensores integrados o externos para el control de la temperatura y, si es necesario, de la humedad ambiente y la temperatura de la superficie exterior de la cubierta por medio de un control de realimentación.

La invención permite además el uso de sistemas ópticos externos de tipo transmisión.

20 **Breve descripción de las figuras**

Las figuras 1A y 1B ilustran de forma esquemática en sección longitudinal dos formas de realización diferentes de un dispositivo microfluídico que pone en práctica una primera forma de realización del método de la invención;

la figura 2 ilustra de forma esquemática una vista en planta desde arriba de una forma de realización del dispositivo microfluídico de la figura 1;

- 25 la figura 3 ilustra de forma esquemática a una escala ampliada una sección vertical del dispositivo microfluídico de la figura 2;

la figura 4 es un diagrama que muestra la variación en el punto de rocío de acuerdo con la humedad y la temperatura del aire;

- 30 la figura 5 ilustra de forma esquemática en sección longitudinal un dispositivo microfluídico que pone en práctica una segunda forma de realización del método de la invención; y

las figuras 6 y 7 son unos diagramas que muestran la variación en la temperatura de la superficie superior del dispositivo microfluídico de la figura 2 sobre la base de la variación de algunos parámetros operativos.

Divulgación detallada

- 35 En lo sucesivo en el presente documento, el término partículas se usará para indicar unas entidades micrométricas o nanométricas, naturales o artificiales, tales como células, componentes subcelulares, virus, liposomas, niosomas, microperlas y nanopérlas, o también unas entidades más pequeñas tales como macromoléculas, proteínas, ADN, ARN, etc., también gotas de líquido inmiscible en el medio de suspensión, por ejemplo, aceite en agua, o agua en aceite, o también gotas de líquido en gas (tal como agua en aire) o burbujas de gas en líquido (tal como aire en agua).

- 40 El objeto de la presente invención es la provisión de un método y un dispositivo para el análisis óptico de partículas a unas temperaturas por debajo de la temperatura ambiente y, en particular, a unas temperaturas relativamente bajas (3 - 6 °C), manteniéndose las partículas en suspensión en un fluido, por lo general un líquido, que está dispuesto en el interior de un dispositivo microfluídico, que también permite la manipulación de las partículas.

- 45 Con manipulación se pretende indicar el control de la posición de partículas únicas o grupos de partículas o el movimiento en el espacio de dichas partículas o grupos de partículas.

Dicha manipulación se puede llevar a cabo por medio de cualquier medio que esté integrado en el dispositivo de acuerdo con la invención o interaccionando con el mismo desde el exterior. Por lo general, la manipulación se lleva a cabo por medio de una agrupación de electrodos, que se pueden activar y direccionar de forma selectiva, integrados

en un sustrato y que está orientada hacia un único contraelectrodo que también actúa como una cubierta de la microcámara, de acuerdo con la descripción en el documento PCT/WO 00/69565, el contenido del cual se incorpora en el presente documento para las partes necesarias.

5 Con referencia a las figuras 1A, B y 2, el número de referencia 1a, de forma respectiva 1b, indica un dispositivo para llevar a cabo un análisis óptico de unas partículas 2 que están contenidas en suspensión en un fluido 3, por lo general un líquido, capaz de operar al mantener las partículas 2 y el líquido 3 a unas temperaturas por debajo de la temperatura ambiente y, en particular, casi hasta cero grados centígrados, por lo general unas temperaturas entre 3 y 6 °C y, preferiblemente, a una temperatura de aproximadamente 4 °C.

10 El dispositivo 1a, 1b comprende, de acuerdo con los croquis esquemáticos bosquejados que se ilustran en la figura 1A y 1B, en donde detalles similares o idénticos se indican por medio de los mismos números de referencia por razones de simplicidad, al menos una microcámara 4 que contiene durante el uso el fluido 3 y que está delimitada entre una primera superficie 5 y una segunda superficie 6; y unos medios de enfriamiento, que se indican en conjunto por 7, que están acoplados térmicamente con la superficie 5 por medio de una primera resistencia térmica RLW.

15 Con el término "microcámara" se pretende indicar en el presente caso y en lo sucesivo una cámara adecuada para contener un volumen pequeño del fluido 3, por lo general entre 1 nanolitro y 5000 microlitros y, preferiblemente, entre 1 microlitro y 100 microlitros y que tiene una de sus tres dimensiones que mide menos de 1 mm.

El dispositivo 1 comprende además una superficie de inspección térmica 8 que está acoplada térmicamente con la superficie 6 por medio de una segunda resistencia térmica RHI.

20 Los medios de enfriamiento 7 pueden ser de cualquier tipo apropiado adaptado para sustraer calor de la microcámara 4 mientras el dispositivo 1a / 1b se encuentra operativo y lleva a cabo la manipulación de las partículas 2, en una cantidad tal como para mantener el fluido 3 a una primera temperatura previamente establecida T1, por debajo de la temperatura ambiente, tal como ya se ha indicado habitualmente de 4 °C.

25 En el ejemplo que se ilustra en la figura 1B, los medios de enfriamiento 7 consisten en una placa 10 que está dispuesta en contacto con la resistencia térmica RLW y en la que están integradas una o más células de Peltier 11 (de las cuales solo se muestra una, de forma únicamente esquemática, debido a que la misma es conocida de por sí) que se controlan por medio de un dispositivo 12 para controlar la temperatura interna de la cámara 4, que se representa de forma únicamente esquemática por medio de un bloque.

30 En el ejemplo que se ilustra en la figura 1A, por otro lado, los medios de enfriamiento 7 consisten en una segunda microcámara 10c, en la que discurre un flujo de refrigerante 11c, en contacto con la resistencia térmica RLW; dicho refrigerante se indica por medio de una flecha en la figura 1A y se hace circular en un circuito cerrado a partir del cual el calor que se retira de la microcámara 4 a través de la superficie 5 se elimina continuamente por medio de una bomba 12c que está acoplada con una célula de Peltier, 13c, que se indica de forma esquemática por medio de un bloque.

35 Con referencia también a las figuras 2 y 3, la resistencia térmica RLW consiste en una lámina plana 14, por ejemplo, una lámina de cuarzo, transparente si es necesario, una primera cara superior de la cual consiste en la superficie 5 y una segunda cara inferior de la cual consiste en una superficie 15 que está dispuesta en contacto con la placa 10; la resistencia térmica RHI consiste en una lámina plana 16, realizada necesariamente de un material transparente, por ejemplo, que consiste en una lámina de cuarzo o vidrio mineral, una primera cara de la cual, que está orientada
40 hacia el lado opuesto a la microcámara 4, constituye la superficie de inspección óptica 8, y una segunda cara de la cual, opuesta a la primera cara, constituye la superficie 6.

Las dos láminas 14, 16 están dispuestas orientadas hacia y están separadas una de otra por medio de un separador perimetral 18 (que se indica de forma esquemática solo por medio de una línea en la figura 1), que delimita junto con las láminas 14, 16 el volumen interno de la microcámara 4. O bien esta última, o bien la totalidad de la unidad que
45 consiste en las láminas 14, 16 y el separador 18, descansa sobre una base 19 (la figura 3).

El dispositivo 1a / 1b de acuerdo con la invención también comprende unos medios electrónicos para manipular las partículas 2 antes, durante y después del análisis óptico de las mismas.

Si se usan jaulas de potencial de dielectroforesis, tal como se describe en el documento WO 00/69565, para manipular las partículas 2, la superficie 5 constituye el sustrato que soporta una agrupación 100 de microelectrodos, mientras que la superficie 6 está enteramente recubierta por una capa de ITO 101, que constituye el contraelectrodo. Además de los microelectrodos de la agrupación 100, uno o más sensores ópticos se pueden integrar en el sustrato para detectar cualquier alteración (debido, por ejemplo, a la presencia de una partícula 2) de la luz ambiente que penetra en la microcámara 4 a través de la superficie 8. Como alternativa o además, se pueden proporcionar

sensores ópticos en el exterior de la microcámara 4, por ejemplo, que consisten en un microscopio sencillo 21 de cualquier tipo, que se indica de forma esquemática por medio de un bloque en la figura 1A y 1B, que observa el interior de la microcámara 4 a través de la superficie 8. El microscopio 21 puede identificar imágenes y recibir toda luz que se refleje a partir del sustrato que consiste en la superficie 5 por ejemplo, de acuerdo con las trayectorias que se indican por medio de las flechas en la figura 1A, 1B.

De acuerdo con una primera forma de realización de la invención, la segunda resistencia térmica RHI tiene un valor de conductividad térmica de al menos un orden de magnitud y, preferiblemente, dos órdenes de magnitud, por debajo del de la primera resistencia térmica RLW; por ejemplo, con los materiales que se han indicado en lo que antecede, la lámina 14 tiene una conductividad de aproximadamente 150 W / K·m mientras que la lámina 16 tiene una conductividad térmica de solo aproximadamente 1,2 W / K·m.

En combinación con esta característica, el dispositivo 1 comprende además, de acuerdo con la invención, unos medios 24, que se indican de forma esquemática por medio de un bloque en la figura 1, para establecer un flujo térmico F (que se indica de forma esquemática por medio de una flecha doble en la figura 1) en la superficie de inspección óptica 8 de tal modo que la superficie 8 se mantiene constantemente a una temperatura T2 más alta que la temperatura Td de condensación de la humedad ambiente (el punto de rocío) que está contenida en el aire que se solapa durante el uso con la superficie de inspección óptica 8.

Tal como se ilustra en el diagrama de la figura 4, la temperatura Td se puede calcular fácilmente de acuerdo con la temperatura del aire ambiente y la cantidad de humedad que se encuentra presente en el aire ambiente. Para los valores medios que habitualmente se hallan en un laboratorio (23 °C y un 50 % de humedad), la temperatura Td es aproximadamente 12 °C. Es evidente que, debido a que la temperatura T1 en la microcámara 4 es aproximadamente 4 °C, la temperatura de la superficie 8 alcanzaría de forma inevitable, durante el uso, por conducción, una temperatura más baja que Td, produciendo un emborronamiento de la superficie 8.

Este fenómeno se evita de acuerdo con la invención por medio de la combinación de una elección apropiada de la relación entre las conductividades térmicas de las resistencias térmicas RLW y RHI y la presencia simultánea de los medios 20. Esta combinación permite, sorprendentemente, por un lado, tal como se verá, que una temperatura T2 de la superficie 8 se mantenga siempre más alta que la temperatura Td del aire que se solapa durante el uso con la superficie 8, con el fin de evitar y / o eliminar el emborronamiento de la superficie 8 cuando la temperatura T1 en el interior de la microcámara 4 es muy baja. Por otro lado, el posible calentamiento del fluido 3 se evita o al menos se limita. De hecho, se ha mostrado de forma experimental que, incluso si un flujo térmico "caliente" alcanza la microcámara 4, cualquier aumento en la temperatura T1 se puede evitar fácilmente mediante la bajada de la temperatura que es establecida por la unidad de control 12 sobre la célula de Peltier 11 sin desencadenar unos movimientos convectivos no deseados en el interior de la microcámara 4.

De acuerdo con una primera forma de realización posible de la invención, el dispositivo 1b (o 1a) comprende unos medios 24b (las figuras 2, 3) para calentar la superficie de inspección óptica 8 por encima del punto de rocío del aire ambiente, o por encima de la temperatura Td.

Dichos medios 24b consisten en una resistencia directamente aplicada solidariamente en una pieza sobre la superficie 8 de la lámina 16. De acuerdo con un ejemplo de forma de realización que se ilustra de forma únicamente esquemática y solo parcialmente en la figura 1, la resistencia 24b consiste en una capa resistiva conductora transparente 25, por ejemplo, ITO, aplicada de manera uniforme por encima de la totalidad de la superficie de inspección óptica 8.

En una segunda forma de realización posible de la invención, la resistencia 24b consiste en al menos uno y, preferiblemente, una pluralidad de microrresistencias filiformes, o hilos, 26 aplicadas solidariamente en una pieza a la superficie de inspección óptica 8, que se disponen preferiblemente en forma de peine y que están separadas de manera uniforme una de otra.

Las microrresistencias filiformes 26 están conectadas eléctricamente, cada una en el mismo extremo de las mismas, a un bastidor de distribución 27 de la corriente eléctrica de suministro, que consiste en una hoja de metal en forma de peine, pero que está dispuesto opuesto a las microrresistencias filiformes 26; dicho de otra forma, los "dientes" 28 respectivos de la hoja de metal en forma de peine 27 están orientados hacia el lado opuesto a los hilos 26 y se extienden al exterior de la superficie 8, estando dispuestas sobre un borde 29 del dispositivo 1 en el exterior del área operativa que consiste en la microcámara 4.

El bastidor 27 recibe la corriente eléctrica de suministro a través de los "dientes" 28, por medio de una pluralidad de puentes conductores 30 que conectan una pluralidad de puntos diferentes del bastidor 27, que consisten en los "dientes" 28, con al menos un colector común 31 que está dispuesto en el elemento de base 19 del dispositivo 1.

Los puentes conductores 30 consisten en unos hilos de metal deformables doblados para formar bastidores con

forma de S o bifurcaciones sobre el plano de la figura 3. El suministro eléctrico de los electrodos y cualquier sensor óptico en el sustrato que se pueda encontrar presente sobre la superficie 5 también se proporciona por medio de unos puentes 30, usando otros colectores 32, 33.

5 Para permitir que el dispositivo 1b (1a) opere correctamente, es decir, para mantener la temperatura T2 por encima de la temperatura Td del aire que se solapa durante el uso con la superficie 8 sin una pérdida de calor excesiva hacia la microcámara 4, para mantener la temperatura de la totalidad de la superficie 8 tan uniforme como sea posible y no interferir con los sensores ópticos integrados y / o con los sensores externos, como el microscopio 21, las microrresistencias filiformes 26 han de tener una anchura L (la figura 3) igual a aproximadamente un décimo del espaciamiento P (es decir, la separación) entre las mismas en una dirección transversal con respecto a su extensión longitudinal. Dicho de otra forma, la relación L / D ha de ser preferiblemente igual a 1 / 10 y, en cualquier caso, se encuentra entre 1 / 2 y 1 / 100.

15 Para mejorar el desempeño del dispositivo 1b (1a), preferiblemente este también comprende unos medios 35 (la figura 2) para medir continuamente durante el uso la temperatura T2 de la superficie 8 y unos medios 36 para operar en realimentación los medios 24b para calentar la superficie de inspección óptica; por ejemplo, los medios de detección de temperatura 35 pueden consistir en una resistencia eléctrica que se aplica sobre la superficie 8, que varía su resistividad de acuerdo con la temperatura T2, o de un sensor óptico que está dispuesto orientado hacia la superficie 8; en el primer caso, una de las microrresistencias filiformes 26 se puede usar como la resistencia eléctrica, realizando las conexiones eléctricas apropiadas. Los medios 36 consisten en el microprocesador que controla la totalidad de las funciones del dispositivo 1b (1a) o de un microprocesador dedicado, y los mismos interactúan por ejemplo, con una unidad de suministro de alimentación 37 (la figura 3) que controla la corriente que se suministra al bastidor 27 por medio de los puentes 30. Ha de haber un número grande de los mismos, de tal modo que los intervalos de separación entre los mismos hacen la temperatura en el lado opuesto de la lámina 16 sustancialmente uniforme.

25 Observando los parámetros que se indican, la tendencia del gradiente de temperatura a través del espesor de la lámina 16 para niveles diferentes de potencia eléctrica que se suministran a los hilos o "dedos" 26 es la que se muestra en la figura 6, que representa el peor caso, dicho de otra forma, en la parte media del espaciamiento P, es decir, la temperatura en el área superficial 8 sin resistencias que estén comprendidas entre dos microrresistencias filiformes o "dedos" 26, y en la figura 7, que muestra el mejor caso, es decir, la temperatura directamente por debajo de una microrresistencia o "dedo" 26. El gradiente de temperatura que se puede mantener a través de la lámina 16, teniendo en cuenta las pérdidas de calor hacia el exterior, permite que se mantenga sobre la superficie 6 una temperatura muy cerca de T1, mientras que la temperatura T2 sobre la superficie 8 es uniformemente más alta que la temperatura Td.

Para este fin, y con independencia de la forma de realización de los medios de calentamiento 24b, también es conveniente que el espesor de la lámina 16 se determine en la fase de proyecto usando las siguientes fórmulas:

$$35 \quad H_{lid} > \left(\frac{T_{dp} - T_0 - \Delta T_{m\acute{a}x}}{\Delta T_{m\acute{a}x}} \right) \left(\frac{\sigma_{lid}}{\sigma_{buf}} \right) H_c \quad (1)$$

$$\Delta T_{m\acute{a}x} = (T_{buf} - T_0)_{m\acute{a}x} \quad (2)$$

40 en donde H_{lid} y H_c son, de forma respectiva, el espesor de la lámina 16 que constituye la cubierta de la microcámara 4 y el espesor de la propia microcámara 4, T_{dp} es la temperatura del punto de rocío del aire ambiente, T₀ es la temperatura operativa teórica deseada en el interior de la microcámara 4, T_{buf} coincide con la temperatura T1, es decir, esta es la temperatura del líquido 3, ΔT_{máx} es el aumento máximo en la temperatura tolerable en el interior de la microcámara 4 con respecto a la temperatura operativa teórica T₀, σ_{lid} y σ_{buf} son la conductividad térmica del material de la lámina 16 y del líquido (tampón) 3 de forma respectiva.

45 Con referencia a la figura 5, en donde los detalles que son similares o idénticos a los que ya se han descrito se indican por medio de los mismos números, el dispositivo 1b comprende unos medios de calentamiento 24c que están ubicados en el exterior de la lámina 16 y que consisten en el ejemplo que se ilustra en un ventilador 40 y una resistencia 41 que, controlados por medio de la unidad de control 36 que está conectada a un sensor 35 de la temperatura T2 de la superficie 8, calientan esta última, enviando a la misma un flujo de aire ambiente.

50 Sobre la base de la descripción, la invención también se refiere, por lo tanto, a un método para llevar a cabo el análisis óptico de unas partículas 2 que están contenidas en suspensión en un fluido 3, a unas temperaturas por debajo de la temperatura ambiente, que comprende las etapas de:

- i. - disponer las partículas 2 en suspensión en el interior de al menos una microcámara 4 que contiene el fluido 3 en un espacio que está delimitado entre las superficies 5 y 6;
- ii. - acoplar térmicamente la superficie 5, por medio de la resistencia térmica RLW, con los medios de enfriamiento 7 adaptados para sustraer calor del fluido 3, y acoplar térmicamente la superficie 6, por medio de la resistencia térmica RHI, con la superficie de inspección óptica 8 que se ha de mantener despejada;
- iii. - llevar el fluido 3 a la temperatura T1, más baja que la temperatura ambiente, por medio de los medios de enfriamiento 7; y
- iv. - mientras las partículas 2 se están analizando ópticamente, establecer en la superficie de inspección óptica 8 un flujo térmico F de tal modo que la superficie de inspección óptica 8 se mantiene constantemente a la temperatura T2, más alta que la temperatura Td de condensación de la humedad ambiente (el punto de rocío) que está contenida en el aire que se solapa con la superficie de inspección óptica;
- v. - en donde las resistencias térmicas RHI y RLW se eligen de tal modo que la resistencia térmica RHI tiene un valor de conductividad térmica preferiblemente al menos un orden de magnitud por debajo del de la primera resistencia térmica RLW y, en cualquier caso, igual a al menos la mitad de la conductividad térmica de la resistencia térmica RLW.

Por lo general, el flujo térmico F es un flujo térmico de entrada, en el sentido de que la etapa (iv) se lleva a cabo mediante el calentamiento de la superficie de inspección óptica 8 por encima del punto de rocío del aire ambiente, tal como se ha ilustrado previamente.

El calentamiento de la superficie 8 se puede obtener, preferiblemente, por efecto Joule, proporcionando sobre la misma, en el exterior de la microcámara 4, una resistencia 24b que se elige de entre el grupo que consiste en: una capa resistiva conductora transparente, por ejemplo, de óxido de indio y estaño (ITO, *Indium Tin Oxide*), o basándose en nanotubos de carbono, o polímeros conductores tales como poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) 25 aplicados de manera uniforme por encima de la totalidad de la superficie de inspección óptica 8; una pluralidad de microrresistencias filiformes 26 que se aplican sobre la superficie de inspección óptica 8, que están dispuestas en forma de peine, que están separadas de manera uniforme una de otra en sentido transversal con respecto a la dirección de extensión longitudinal de la microcámara 4.

Las microrresistencias filiformes 26 que, de acuerdo con una forma de realización que no se ilustra por razones de simplicidad, también se pueden disponer en un patrón de rejilla, o con el fin de cruzarse entre sí, se suministran, en cualquier caso, de tal modo que la distribución de densidad de corriente es uniforme; en el caso que se ilustra, usando el bastidor de distribución de corriente 27 que está dispuesto ortogonal en sentido longitudinal con respecto a las microrresistencias filiformes 26 que, a su vez, recibe la corriente por medio de una pluralidad de puentes conductores 30 que conectan una pluralidad de puntos diferentes 28 del bastidor de distribución 27, que están dispuestos sobre el lado opuesto a las microrresistencias filiformes 26, con al menos un colector común 31.

Como alternativa, tal como se ha visto, la superficie de inspección óptica 8 se mantiene a una temperatura más alta que el punto de rocío al forzar un flujo de aire por encima de la misma mediante convección forzada, que se genera, por ejemplo, por medio de un ventilador 40. Dicho flujo contrarresta la bajada de la temperatura de la superficie de inspección óptica 8 debido a la absorción de calor por el sistema de enfriamiento a través del líquido en la microcámara 4, tal como se ilustra en la figura 5.

En cualquier caso, preferiblemente el calentamiento de la superficie de inspección óptica 8 se controla por realimentación mediante la medición continua de la temperatura actual T2 de la misma, preferiblemente por medio de una resistencia 35 que se aplica a la superficie de inspección óptica 8 o por medio de un sensor de infrarrojos que está dispuesto orientado hacia la superficie de inspección óptica 8.

De acuerdo con una forma de realización diferente de la invención, no obstante, la etapa (iv) se puede llevar a cabo de una forma igualmente eficaz mediante el enfriamiento de una cantidad de aire ambiente que rodea inmediatamente la superficie de inspección óptica 8 que se solapa con la misma, a una temperatura T3 de tal modo que el punto de rocío de dicha cantidad de aire se vuelve más bajo que la temperatura T2 de la superficie de inspección óptica 8 debido a la transmisión térmica por conducción desde y hacia la microcámara 4 a través del espesor de la lámina 16.

Una solución de este tipo se puede poner en práctica por medio de un dispositivo 1b (o la) similar al que se ilustra de forma esquemática en la figura 5, en donde se usa un ventilador 40 para hacer recircular la misma cantidad de aire que se encuentra presente en las proximidades de la superficie 8 a través de un elemento de enfriamiento 41, por ejemplo, que consiste en un conjunto de células de Peltier que están dispuestas, todas ellas, en torno a la lámina 16.

La temperatura Td, en especial en las puestas en práctica que se han descrito previamente, se puede fijar de antemano, tomando 12 °C como una estimación fija, que es el valor que tiene lugar en la mayoría de los casos. Por el contrario, la temperatura actual Td del aire ambiente y el aire enfriado que se solapa con la superficie 8 debido a la acción del ventilador 40 se calcula, por ejemplo, mediante la detección tanto de la temperatura como de la humedad ambiente, y las de dicho aire enfriado, por medio de unos sensores apropiados 42 que están conectados

con la unidad de control 36.

Obviamente, el enfriamiento que es causado por el conjunto de células de Peltier que establece el flujo térmico F requerido de acuerdo con la invención se puede usar para bajar tanto la temperatura como la humedad del aire ambiente, o solo la temperatura o solo la humedad.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el análisis óptico de unas partículas (2) que están contenidas en suspensión en un fluido a unas temperaturas más bajas que la temperatura del punto de rocío, que comprende las etapas de:
 - i. disponer las partículas en suspensión dentro de al menos una microcámara (4) que contiene dicho fluido y que está delimitada entre una primera y una segunda superficie (5, 6);
 - ii. acoplar térmicamente la primera superficie (5), por medio de una primera resistencia térmica (RLW), con unos primeros medios de enfriamiento (7) que están adaptados para sustraer calor del fluido, y acoplar térmicamente la segunda superficie (6), por medio de una segunda resistencia térmica (RHI), con una superficie de inspección óptica (8);
 - iii. llevar dicho fluido a una primera temperatura (T1), más baja que la temperatura del punto de rocío, por medio de dichos primeros medios de enfriamiento;
 - iv. mientras las partículas (2) se están analizando ópticamente, establecer en la superficie de inspección óptica (8) un flujo térmico (F) de tal modo que la superficie de inspección óptica se mantiene constantemente a una segunda temperatura (T2) más alta que la temperatura del punto de rocío (Td) de la humedad ambiente que está contenida en el aire que se solapa con la superficie de inspección óptica (8); eligiéndose dicha primera y dicha segunda resistencias térmicas de tal modo que la segunda resistencia térmica (RHI) tiene un valor de conductividad térmica, preferiblemente, al menos un orden de magnitud más bajo que el de la primera resistencia térmica (RLW) y, en cualquier caso, igual a al menos la mitad de la conductividad térmica de la primera resistencia térmica (RLW).
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la etapa (iv) se lleva a cabo mediante el calentamiento de la superficie de inspección óptica (8) por encima del punto de rocío del aire ambiente.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** la superficie de inspección óptica se calienta por efecto Joule, al disponer sobre la misma, externamente con respecto a la microcámara (4), una resistencia (24b) que se elige de entre el grupo que consiste en: una capa resistiva conductora transparente (25), por ejemplo, ITO, aplicada de manera uniforme sobre la totalidad de la superficie de inspección óptica; una pluralidad de microrresistencias filiformes (26) que están dispuestas sobre la superficie de inspección óptica, preferiblemente en forma de peine, que están separadas de manera uniforme una de otra.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** dichas microrresistencias filiformes (26) se suministran de tal modo que la distribución de densidad de corriente es homogénea mediante el uso de un bastidor de distribución de corriente (27) que está dispuesto opuesto a las microrresistencias filiformes que, a su vez, recibe una corriente por medio de una pluralidad de puentes conductores (30), que conectan una pluralidad de puntos diferentes (28) del bastidor de distribución, que están dispuestos sobre el lado opuesto a las microrresistencias filiformes, con al menos un colector común (31).
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** la superficie de inspección óptica (8) se calienta al forzar un flujo de aire por encima de la misma.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la etapa (iv) se lleva a cabo mediante el enfriamiento de una cantidad de aire ambiente que rodea inmediatamente la superficie de inspección óptica (8) y que, por lo tanto, se solapa con la superficie de inspección a una temperatura de tal modo que el punto de rocío (Td) de dicha cantidad de aire es más bajo que dicha segunda temperatura (T2) de la superficie de inspección óptica.
7. Un método de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado por que** la temperatura de la superficie de inspección óptica se controla por realimentación mediante la medición continua de la temperatura presente (T2) de la superficie de inspección óptica, preferiblemente por medio de una resistencia que se aplica a dicha superficie de inspección óptica (35), o por medio de un sensor de infrarrojos que está dispuesto orientado hacia la superficie de inspección óptica.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** la temperatura (T2) a la que mantener la superficie de inspección óptica se calcula como una función de los parámetros temperatura del aire ambiente y humedad del aire ambiente, que se detectan continuamente por medio de unos sensores apropiados.
9. Un aparato (1a, 1b) para el análisis óptico de unas partículas (2) que están contenidas en suspensión en un fluido (3) a unas temperaturas más bajas que la temperatura del punto de rocío, que comprende:
 - al menos una microcámara (4) que contiene dicho fluido y que está delimitada entre una primera (5) y una segunda (6) superficie;
 - unos primeros medios de enfriamiento (7) que están acoplados térmicamente con la primera superficie por medio de una primera resistencia térmica (RLW) y están adaptados para sustraer calor de la microcámara en

- una cantidad tal como para mantener dicho fluido a una primera temperatura previamente determinada (T1), más baja que la temperatura del punto de rocío; y
- una superficie de inspección óptica (8) que está acoplada térmicamente con la segunda superficie por medio de una segunda resistencia térmica (RH1); **caracterizado por que**, en combinación:
- 5 - la segunda resistencia térmica (RH1) tiene un valor de conductividad térmica, preferiblemente, de al menos un orden de magnitud, e incluso más preferiblemente, de dos órdenes de magnitud más bajo que el de la primera resistencia térmica (RLW) y, en todos los casos, igual a al menos la mitad de la conductividad térmica de la primera resistencia térmica (RLW); y
- 10 - el aparato comprende adicionalmente unos medios (24) para establecer en la superficie de inspección óptica (8), mientras el aparato (1a / 1b) se encuentra operativo y la manipulación y / o el análisis óptico de las partículas (2) se están llevando a cabo con el mismo, un flujo térmico (F) de tal modo que la superficie de inspección óptica se mantiene constantemente a una segunda temperatura (T2), más alta que la temperatura del punto de rocío (Td) de la humedad ambiente que está contenida en el aire que se solapa con la superficie de inspección óptica (8) durante el uso.
- 15 10. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** este comprende unos medios (24b; 24c) para calentar la superficie de inspección óptica (8) por encima del punto de rocío del aire ambiente.
- 20 11. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** dichos medios para calentar la superficie de inspección óptica consisten en una resistencia (24b) que está constituida por: una capa resistiva conductora transparente (25), por ejemplo, ITO, aplicada de manera uniforme sobre la totalidad de la superficie de inspección óptica; o una pluralidad de microrresistencias filiformes (26) aplicadas solidariamente en una pieza sobre la superficie de inspección óptica (8) y que están dispuestas sobre la misma, preferiblemente en forma de peine, que están separadas de manera uniforme una de otra.
- 25 12. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado por que** dichas microrresistencias filiformes (26) están conectadas eléctricamente, cada una sobre el lado del mismo extremo de las mismas, a un bastidor de distribución de corriente (27) que está constituido por una hoja de metal que recibe una corriente eléctrica por medio de una pluralidad de puentes conductores (30) que conectan una pluralidad de puntos diferentes (28) del bastidor de distribución, que están dispuestos sobre el lado opuesto a las microrresistencias filiformes, con al menos un colector común (31) que está dispuesto en un elemento de base (19) del aparato que soporta la microcámara; teniendo dichas microrresistencias filiformes (26) una anchura igual a aproximadamente un décimo del espaciamiento entre
- 30 las mismas, en una dirección transversal con respecto a su extensión longitudinal.
- 35 13. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** dichos medios (24) para establecer dicho flujo térmico (F) en la superficie de inspección óptica (8) comprenden unos medios de ventilación forzada (40) de la superficie de inspección óptica (8) y, preferiblemente, unos medios de calentamiento o de enfriamiento (41) del flujo de ventilación forzada.
- 40 14. Un aparato de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado por que** este comprende unos medios (35) para medir dicha segunda temperatura (T2) y unos medios (36; 37) para accionar en realimentación dichos medios (24) para establecer dicho flujo térmico (F) en la superficie de inspección óptica (8); y, preferiblemente, unos medios para calcular el punto de rocío del aire ambiente (Td).
- 40 15. Aparato según la reivindicación 9, **caracterizado por que** este comprende unos medios electrónicos (100, 101) para llevar a cabo la manipulación de dichas partículas (2) en dicha microcámara (4).

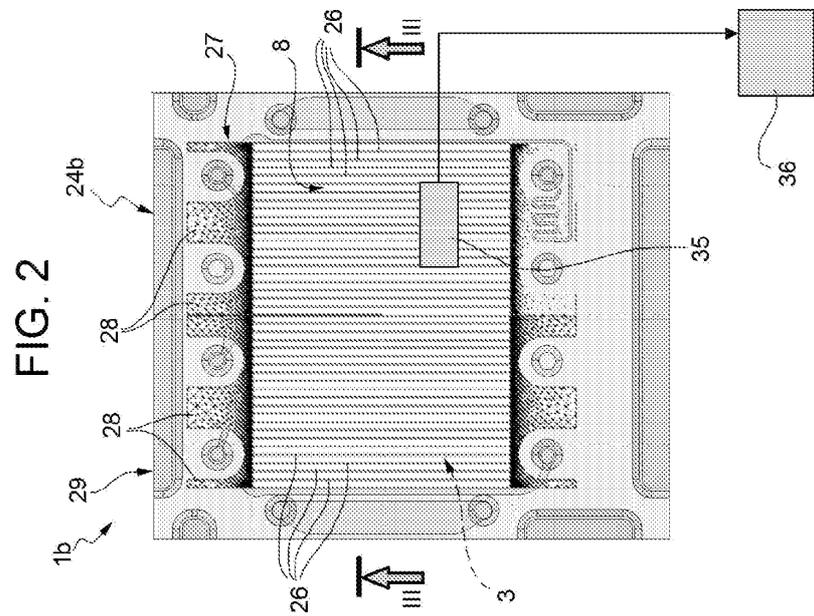
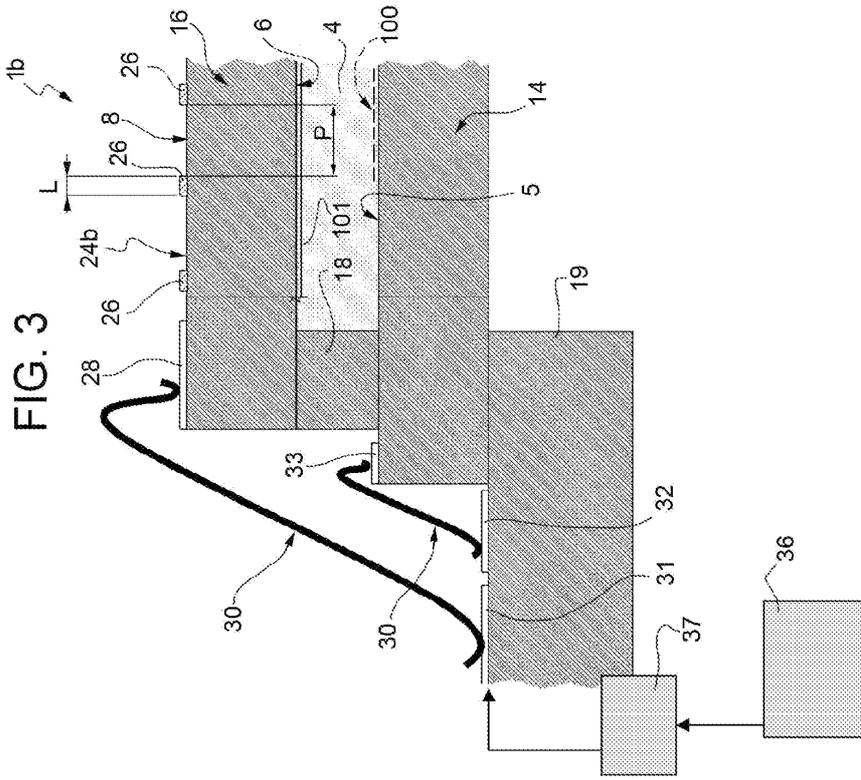


FIG. 5

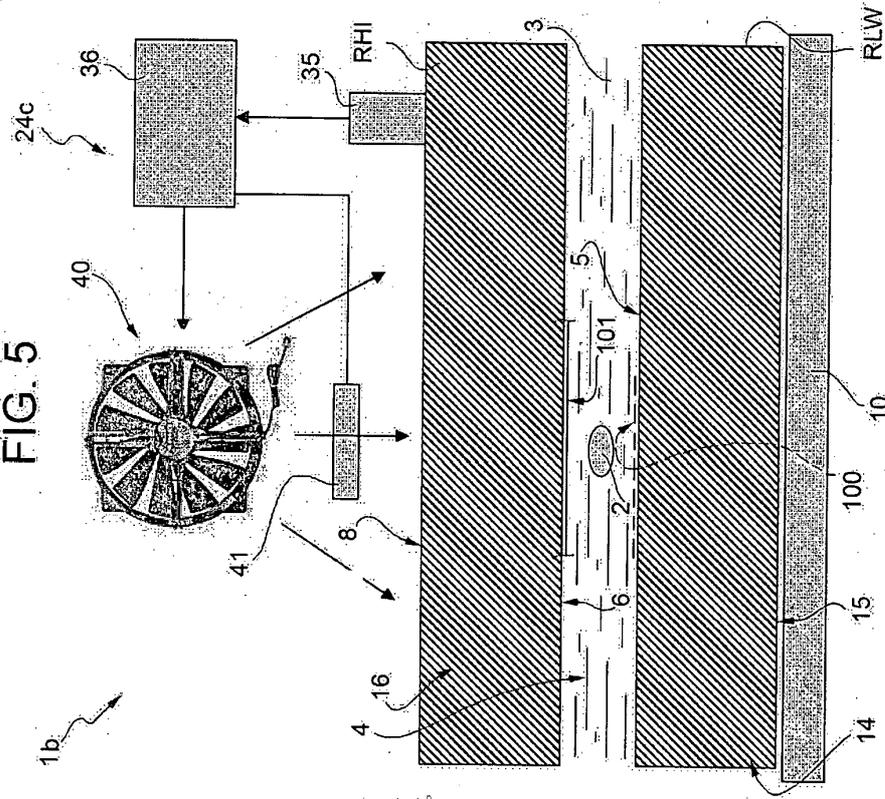


FIG. 4

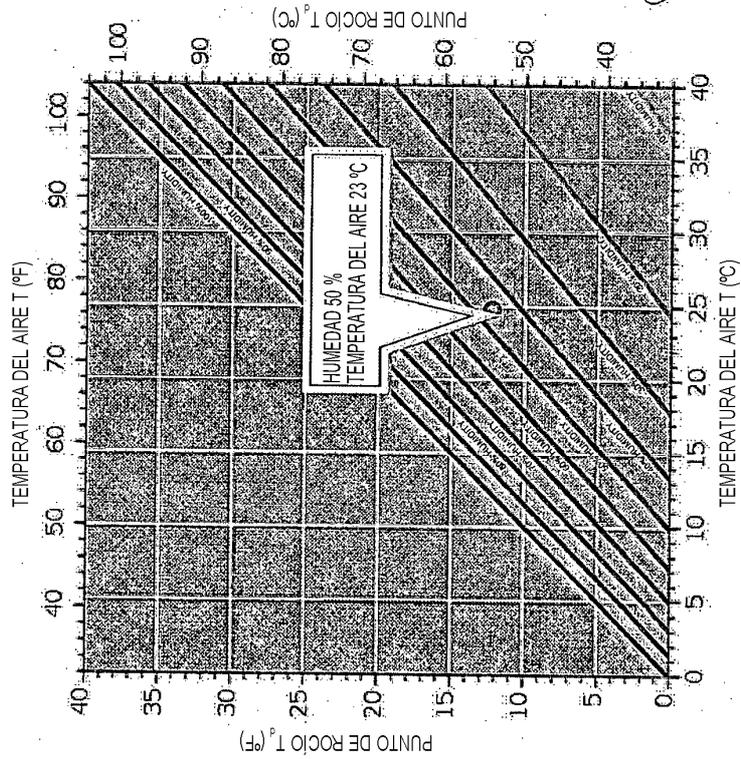


FIG. 7

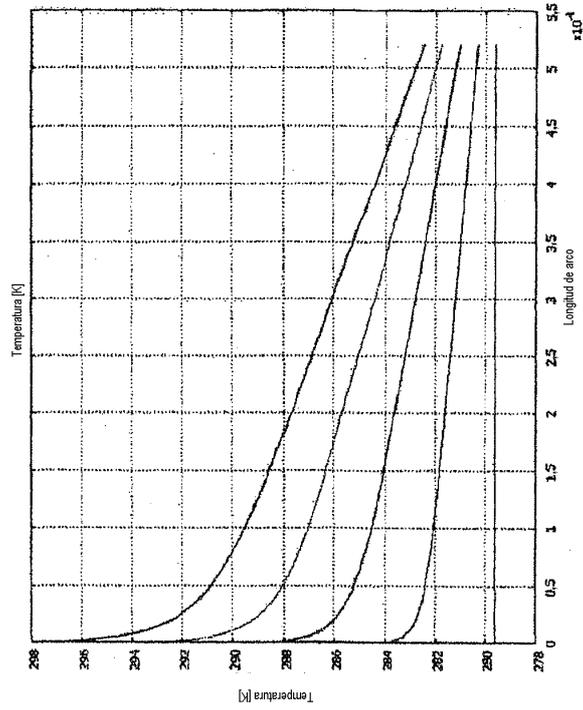


FIG. 6

