

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 372**

51 Int. Cl.:

G01N 21/65	(2006.01)
G01N 21/05	(2006.01)
B01L 3/00	(2006.01)
G01N 21/64	(2006.01)
G01N 33/14	(2006.01)
G01J 3/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2011 PCT/GB2011/001406**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO12042206**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2011 E 11767742 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2622325**

54 Título: **Espectroscopia Raman localizada a base de guías de onda**

30 Prioridad:

28.09.2010 GB 201016270

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2019

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF ST ANDREWS (100.0%)
College Gate North Street St Andrews
Fife KY16 9AJ, GB**

72 Inventor/es:

**ASHOK, PRAVEEN CHERIYAN;
SINGH, GAJENDRA PRATAP y
DHOLAKIA, KISHAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 734 372 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

Espectroscopia Raman localizada a base de guías de onda

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un sistema de detección espectroscópica de Raman localizado que tiene guías de onda integradas en un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo microfluídico. La disposición física del dispositivo localiza la muestra problema y las guías de onda integradas localizan la excitación y la recogida de la señal Raman.

10

Antecedentes de la invención

La espectroscopia Raman es una herramienta potente y efectiva para estudios analíticos de muestras biológicas y químicas. La dispersión Raman es una dispersión de luz inelástica de una muestra que puede producir una huella molecular de las moléculas constituyentes. Sin embargo, una limitación inherente de esta técnica es la baja sección transversal Raman de las biomoléculas. Por lo tanto, se requieren largos tiempos de integración para obtener una buena relación señal a ruido. Sin embargo, los espectros Raman tienen un rico contenido de información y un solo espectro Raman puede proporcionar información sobre todos los constituyentes moleculares de la muestra. La espectroscopia Raman tiene numerosas áreas de aplicación. Por ejemplo, se ha utilizado para analizar el whisky, véase, por ejemplo A. Nordon, A. Sills, R. T. Burn, F. M. Cusick y D. Littlejohn "Comparison of non-invasive NIR and Raman spectrometries for determination of alcohol content of spirits," *Analytica Chimica Acta* 548, 148-158 (2005). Este estudio compara la espectroscopia NIR con la espectroscopia Raman y concluye que la espectroscopia Raman funciona mejor para la calibración de la concentración. Sin embargo, los autores expresan preocupación sobre la implementación de una técnica de detección espectroscópica Raman basada en láser en una línea de producción que utiliza dispositivos de detección Raman en el espacio libre. Asimismo, los tiempos de adquisición de Raman típicos varían de 10 segundos a varios minutos y requieren volúmenes de muestra en el intervalo de mililitros.

15

20

25

La espectroscopia Raman se ha combinado con sistemas microfluídicos. Para superar la limitación de la sección transversal inherentemente baja de Raman, se han empleado esquemas de detección basados en espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS) en sistemas microfluídicos. Otros experimentos han utilizado la microscopia Raman confocal para la monitorización en línea de reacciones químicas. En todas estas aplicaciones, la monitorización se realiza utilizando un microscopio Raman a granel y un chip microfluídico. Sin embargo, el uso de sistemas basados en microscopio para recopilar datos Raman de chips microfluídicos puede causar problemas, ya que la señal se adquiere a través de un sustrato que tiene su propia señal de fondo. Esto limita la eficiencia de detección del sistema. El uso de un microscopio también impide la miniaturización.

30

35

Hay dos problemas principales cuando se utiliza la espectroscopia Raman en microfluídica: la intensidad de los espectros Raman y el fondo del sustrato del chip microfluídico. El primer problema se puede abordar utilizando largos tiempos de adquisición, enfoques de detección basados en SERS, etc. El último problema se puede abordar utilizando un chip microfluídico basado en vidrio de sílice fundido, que habría reducido el fondo de fluorescencia y no habría picos Raman en la región de la huella. Como alternativa, se podrían usar esquemas de detección confocal para evitar el fondo del sustrato. Sin embargo, esto da como resultado un tiempo de adquisición comparativamente más alto que varía de 10 segundos a varios minutos.

40

45

El artículo "Fibre Probe Based Microfluidic Raman Spectroscopy" de Ashok et al, *Optics Express*, Vol 18, no 8, 29 March 2010 describe una sonda de fibra incrustada en canales fluídicos para la detección de Raman. Este método permite el sondaje *in situ* de un analito en un canal fluídico, fabricado utilizando técnicas de fabricación de microfluidos y de este modo evita cualquier fondo del sustrato en los espectros Raman recolectados. Sin embargo, el tamaño del canal fluídico de tales dispositivos está en la escala milimétrica, por lo que no es factible integrar este esquema de detección en chips microfluídicos cuyas dimensiones de canal están en escalas micrométricas.

50

Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona un dispositivo microfluídico que comprende al menos un canal de muestra; al menos una guía de onda de excitación para excitar una señal Raman y al menos una guía de onda de recogida para recoger una señal Raman, en el que la al menos una guía de onda de excitación se coloca de manera que su extremo de salida esté en el canal de muestra y la al menos una guía de onda de recogida esté posicionada de modo que su extremo de entrada está en al menos un canal de muestra, no hay elementos ópticos entre el extremo de la guía de onda de excitación y el canal de muestra para modificar el perfil del haz de salida de la guía de onda de excitación y / o no hay elementos ópticos entre los finales de la guía de onda de recogida y el canal de muestra y la guía de onda de excitación y la guía de onda de recogida son mutuamente ortogonales.

55

60

Las guías de onda de excitación y recogida están incrustadas en el canal microfluídico para excitar y recolectar la señal Raman. Los extremos de las guías de onda se extienden directamente hacia el canal, de modo que pueden contactar con una muestra en su interior.

65

Al usar guías de onda sin elementos ópticos en sus extremos, la distancia relativa entre los extremos de las guías de onda de excitación y recogida es del orden del tamaño del núcleo de la guía de onda. Esto da como resultado una excitación localizada y la recogida de la señal Raman desde las inmediaciones del extremo de la guía de onda, lo que maximiza la eficiencia de recogida de la señal Raman.

5 Dado que el haz de salida de la guía de ondas es divergente, al garantizar que el área de la sección transversal de la guía de ondas sea la misma que la del canal microfluídico, en este enfoque de detección se consulta toda la sección transversal del canal microfluídico. Esto ayuda a lograr un muestreo del volumen máximo disponible de la muestra en la región de detección, lo que aumenta la sensibilidad de la detección. La dimensión microfluídica de los canales permite examinar volúmenes de muestra muy bajos.

Las guías de onda integradas de la invención permiten la detección de Raman sin alineación. La muestra que debe examinarse solo necesita ser inyectada en el canal microfluídico. Por lo tanto, el dispositivo de la invención se puede usar para la detección de analitos con una preparación mínima de la muestra y una alineación óptica.

15 La guía de onda de excitación y / o recogida puede ser una fibra óptica. En particular, la guía de onda de excitación y / o recogida puede ser una fibra óptica multimodo. Con la elección de fibra con diferentes dimensiones físicas o con la elección de guías de onda que pueden fabricarse con diferentes dimensiones físicas, el esquema de detección es escalable para adaptarse a una amplia gama de dimensiones de microfluidos. Por lo tanto, este esquema podría integrarse fácilmente con otros diseños funcionales de microfluidos.

La guía de onda de excitación y / o recogida puede estar integrada en un material que forma un cuerpo principal del dispositivo.

25 La distancia entre el final de las guías de onda de excitación y recogida puede ser del orden del tamaño del núcleo de cada guía de onda.

El canal de muestras puede ser al menos parte de un canal microfluídico que permite que el fluido fluya a través de él.

30 El tamaño del canal de muestras/de microfluidos puede ser <500 μm

Los extremos de la guía de onda de excitación y la guía de onda de recogida definen el volumen de detección de la muestra.

35 El dispositivo puede integrarse con uno o más dispositivos microfluídicos funcionales, por ejemplo, un dispositivo microfluídico adaptado para generar microgotas y / o un microrreactor para permitir que se produzcan una o más reacciones dentro del dispositivo.

40 El canal de muestras/de microfluidos, la guía de onda de excitación y la guía de onda de recogida pueden tener sustancialmente las mismas dimensiones periféricas.

El canal de muestras/de microfluidos, la guía de onda de excitación y la guía de onda de recogida están dispuestas en una configuración cruzada.

45 El canal de muestras / de microfluidos y una de la guía de onda de excitación y la guía de onda de recogida pueden estar dispuestos en una configuración en T.

50 Se pueden proporcionar medios para hacer que el fluido fluya a través del dispositivo. Por ejemplo, se puede usar una bomba para causar el flujo de fluido. La bomba puede ser una bomba de jeringa. La bomba puede activarse manualmente o puede ser accionada mecánicamente.

55 El dispositivo de la invención tiene una cámara de muestra de bajo volumen y está libre de alineación. Se puede utilizar para analizar cualquier fluido, por ejemplo, fluidos biológicos. Como otro ejemplo, la invención se puede utilizar para el análisis de whisky escocés. Al aprovechar las ventajas de los optofluídicos, la invención ofrece portabilidad y detección rápida con un tiempo de adquisición relativamente bajo (2 s) y un volumen de muestra muy bajo (20 μl). Además, las muestras se pueden analizar sin ninguna etapa especial de preparación de muestras. Esto es particularmente ventajoso para el análisis del whisky.

60 Breve descripción de los dibujos

A continuación se describirán varios aspectos de la invención a modo de ejemplo solamente y con referencia a los dibujos adjuntos, de los cuales:

65 Las Figuras 1 (a) a (c) muestran varias vistas de un dispositivo Raman basado en fibra microfluídica integrada para la espectroscopia Raman localizada;

- la figura 2 (a) muestra el volumen de recogida para el dispositivo de la Figura 1 y la Figura 2 (b) muestra el volumen de muestra para el dispositivo de la Figura 1;
- la figura 3 es una gráfica del área bajo el pico Raman de etanol en función del ángulo de recogida;
- la figura 4 es un gráfico del área bajo el pico Raman de etanol en función de la longitud de la fibra;
- 5 la figura 5 es un gráfico del área bajo el pico Raman de etanol en función del tamaño del núcleo de la fibra;
- la figura 6 es un gráfico de la concentración frente a la relación señal / ruido para los espectros Raman de urea;
- la figura 7 es una vista de un microrreactor integrado con el dispositivo de la figura 1;
- la figura 8 (a) muestra varios espectros Raman y la Figura 8 (b) muestra un gráfico de la intensidad máxima frente al caudal para dos productos químicos introducidos en el microrreactor de la Figura 7;
- 10 la figura 9 es una vista de un sistema de microgotas integrado con el dispositivo de la figura 1;
- la figura 10 muestra los espectros Raman recogidos en el canal de generación de microgotas del sistema de la Figura 9 con un tiempo de adquisición de 1 s en comparación con el de los espectros puros de aceite y etanol;
- la figura 11 es un gráfico de la concentración predicha de etanol frente a una concentración de referencia de etanol para la validación de un modelo PLS;
- 15 la figura 12 es un gráfico que muestra la concentración de etanol predicha en varias marcas de whisky usando un modelo PLS;
- la figura 13 es una gráfica de grupo PC1 frente a PC2 de espectros Raman de varias muestras de whisky, cada una de las cuales consta de 200 espectros adquiridos a partir de muestras de whisky fotoblanqueadas;
- 20 la figura 14 es una gráfica de grupo PC1 frente a PC2 para tres muestras de la misma marca de whisky, pero con diferentes edades;
- la figura 15 es una gráfica de grupo PC1 frente a PC2 para cuatro muestras de la misma marca de muestra de whisky, pero maduradas en diferentes toneles;
- la figura 16 es una gráfica de grupo PC1 frente a PC2 para tres muestras de la misma marca de whisky, pero con diferentes características aromáticas, y
- 25 la figura 17 es un gráfico de la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo para tres muestras de whisky para investigar los efectos del fotoblanqueamiento.

Descripción detallada de los dibujos

- 30 Las figuras 1 (a) a (c) muestran un dispositivo microfluídico 10 que tiene un chip microfluídico 11 con guías de onda integradas 12 y 14 adaptadas para mediciones altamente localizadas. Este tiene un canal microfluídico en forma de L 16 con una entrada 18 y una salida 20 para permitir el flujo de fluido. En el ejemplo que se muestra en la Figura 1, las guías de onda integradas son una fibra 12 de excitación integrada que tiene una salida divergente para excitar una señal Raman y una fibra 14 de recogida integrada para recoger la señal Raman. El canal microfluídico 16, la fibra de excitación 12 y la fibra de recogida 14 son mutuamente ortogonales.
- 35

- Cada una de la fibra de excitación 12 y la fibra de recogida 14 termina directamente en el canal microfluídico 16. Ninguna de las fibras de excitación 12 y la fibra de recogida 14 tiene ningún elemento óptico en su extremo o entre su extremo y el canal microfluídico 16. En cambio, los extremos de fibra expuestos, sin filtro, se abren directamente en el canal microfluídico 16. La fibra de excitación 12 y la fibra de recogida 14 no forman parte de un conjunto de sonda convencional, sino que están incrustadas directamente en el dispositivo 10. Por lo tanto, la superficie exterior de cada fibra está en contacto directo con el dispositivo 10. Esta ayuda minimiza el tamaño del dispositivo en general. Para minimizar los volúmenes de la muestra de recogida, la fibra de excitación 12, la fibra de recogida 14 y el canal microfluídico 16 están dimensionados para tener sustancialmente la misma dimensión periférica y están dispuestos en una configuración cruzada, con el volumen de muestra 22 definido en la unión de los extremos de la fibra y el canal microfluídico.
- 40
- 45

- El dispositivo 10 de la invención se basa en dos conceptos de localización. La primera localización es de la recogida Raman. Para una fibra multimodo OH con un tamaño de núcleo de 200 μm , la salida diverge en un ángulo de 12,7°. Para una longitud <200 μm , el tamaño del haz es comparable al tamaño del núcleo, más allá del cual la densidad de potencia cae significativamente. Por lo tanto, es importante recopilar la señal Raman de una región lo más cerca posible del extremo de la fibra de excitación 12. Lo mismo se aplica para la fibra de recogida 14 para una máxima eficiencia de recogida. La Figura 2 (a) muestra cómo la superposición máxima de excitación y recogida se logra al recopilar la señal desde el extremo de la fibra. El segundo aspecto de la localización se refiere a la muestra. Debido a la recogida de señales localizada, la muestra que se va a examinar se puede localizar. Dado que el tamaño del canal suele ser del orden de 100 μm a 200 μm , el volumen de muestra requerido 22 es mínimo, como se muestra en la Figura 2 (b).
- 50
- 55

- Dado que se utiliza un haz divergente para la excitación, se examina toda la sección transversal del canal microfluídico, en contraste con los sistemas en los que se utiliza un haz enfocado para medios de detección confocales o no confocales. Dado que el volumen de examen es mayor, la densidad de potencia total observada por el analito es menor. Por lo tanto, se puede utilizar una mayor potencia, manteniendo una baja densidad de potencia, lo que reduce el tiempo de adquisición requerido en comparación con los sistemas confocales.
- 60

- 65 El chip microfluídico 11 se fabrica utilizando litografía suave en PDMS. Para incrustar la fibra óptica en el chip, los canales de inserción de fibra se definen en el molde para el chip de microfluidos 11. Esto se puede hacer colocando

un trozo de fibra en el sustrato de silicio, en el que se fabrica el molde, y fijándolo utilizando adhesivo curable UV (Norland). Se usó una fotoprotección negativa (SU8, Microchem) para definir los otros canales microfluídico. Para combinar los canales definidos por la fibra y el canal definido por la fotoprotección, la fotoprotección se hizo girar sobre el sustrato de silicio y los canales SU8 se definieron sobre el sustrato utilizando una fotolitografía de tal manera que el canal SU8 está conectado físicamente a la fibra atascada en el molde. Una vez que el molde estuvo listo, el chip de PDMS se fabricó usando litografía suave y, a continuación, se insertaron las fibras de excitación y recogida en el chip como se muestra en la Figura 1 (a). Dado que el canal de inserción de fibra está prediseñado para la geometría de recogida deseada, el requisito de alineación es mínimo al insertar la fibra en el canal.

Se han realizado varios experimentos en el dispositivo 10 de la Figura 1. Para la mayoría de estos (excepto los experimentos que investigan el impacto del tamaño del núcleo), la señal Raman se excitó y se recolectó utilizando fibras multimodo de bajo OH con un tamaño de núcleo de 200 μm (Polymicro Technologies, Arizona, USA). Se utilizó un láser de longitud de onda de 785 nm (Laser2000 (UK) Ltd., potencia máxima de $\sim 450\text{mW}$) para la excitación Raman. El láser se acopló a la fibra óptica a través de un conector SMA y el otro extremo de la fibra se integró en el chip de microfluidos para la excitación Raman. La punta de la fibra de recogida se acopla a un espectrómetro (Shamrock SR-303i, Andor Technology) a través de un sistema telescópico para hacer coincidir el número F de la fibra con el del espectrómetro. Se incorporó un filtro de paso largo (longitud de onda de corte 795,2 nm, Semrock, Inc. USA) entre las dos lentes del telescopio para filtrar los fotones dispersos de Rayleigh. El espectrómetro empleó una rejilla de 400 líneas / mm y estaba equipado con una cámara CCD retroiluminada y de depleción profunda enfriada termoelectricamente (Newton, Andor Technology) para la detección de la señal Raman. La resolución del sistema Raman se midió por el FWHM del pico Raman de silicio a 520 cm^{-1} y se encontró que era mejor que 6 cm^{-1} .

Para investigar el rendimiento del dispositivo 10 de la Figura 1, se tomó etanol (Sigma Aldrich) como analito modelo. Se estudiaron los efectos de tres parámetros, la longitud, el ángulo relativo y el tamaño del núcleo, de las fibras de excitación y recogida 12 y 14, sobre la eficiencia de recogida de la señal Raman y el fondo de fluorescencia. Para estos estudios, la potencia del láser se fijó en 200 mW. Para cada punto de datos, se recogieron 20 espectros Raman de etanol con un tiempo de adquisición de 2 s.

La eficiencia de recogida y el fondo fluorescente dependen en gran medida del ángulo de recogida. El efecto del ángulo relativo entre las fibras de excitación y recogida 12 y 14 se estudió utilizando el pico de etanol a 884 cm^{-1} como el pico de referencia. La Figura 3 muestra la variación de la intensidad del pico y el fondo fluorescente para diferentes ángulos de recogida. Se puede ver que la eficiencia de recogida es máxima para un ángulo de recogida de 90° . Para un ángulo de recogida de $> 90^\circ$, la fibra de recogida 14 recolecta más fondo fluorescente y fotones dispersos de Rayleigh de la fibra de excitación. Por lo tanto, el fondo fluorescente aumenta significativamente, lo que lleva a la saturación del CCD para ángulos de recogida más altos. Para ángulos de recogida de $< 90^\circ$, la superposición entre los volúmenes de excitación y recogida disminuye, lo que reduce la eficiencia de la recogida neta. Por lo tanto, se usó una geometría de recogida ortogonal para investigaciones adicionales.

El efecto de la longitud de la fibra a los espectros de Raman se estudió variando la longitud de las fibras de excitación y recogida 12 y 14 utilizando el pico de etanol a 884 cm^{-1} como el pico de referencia. Los resultados se muestran en la Figura 4. A partir de esto, se puede ver que el fondo de fluorescencia no varía con la longitud de la fibra. Esto se debe a que, en la geometría ortogonal, la mayoría de los fondos de fluorescencia provenientes de la fibra de excitación no serían recolectados por la fibra de recogida. Además, en esta geometría de recogida, la fibra de recogida recolectaría una cantidad mínima de fotones de excitación dispersos de Rayleigh, de modo que la fluorescencia en la fibra de recogida sería mínima. Por lo tanto, en la geometría de recogida ortogonal, la longitud de las fibras de excitación y recogida no afecta a la señal Raman.

El efecto del tamaño del núcleo se estudió mediante la recogida de los espectros Raman de etanol utilizando fibras multimodo con bajo contenido de OH de diferentes tamaños de núcleo manteniendo la potencia de excitación constante. La Figura 5 muestra la variación de la intensidad del pico y el fondo fluorescente en función del tamaño del núcleo. A partir de esto, se puede ver que la eficiencia de recogida se ve afectada principalmente por los parámetros de la fibra de recogida. No hay variación en la eficiencia de recogida cuando se varió el tamaño del núcleo de la fibra de excitación 12, manteniendo constante el tamaño del núcleo de la fibra de recogida. Además, se puede ver que la eficiencia de recogida es comparable para la fibra de tamaño del núcleo de 200 μm (diámetro de revestimiento de 250 μm) y la fibra de tamaño del núcleo de 100 μm (diámetro de revestimiento de 125 μm). Esto demuestra la capacidad de escalado del dispositivo, que se puede adaptar fácilmente a un intervalo de dimensiones de microfluidos.

Para comparar el rendimiento del dispositivo de la invención con su homólogo de sonda de fibra (que tiene filtros al final de las fibras), se calculó el límite de detección mínimo de urea. Los resultados de esto se muestran en la Figura 6. En la Figura 6, la línea discontinua horizontal corresponde al nivel donde el SNR = 1. La intersección de la línea discontinua con la línea que corresponde a la variación de SNR con la concentración proporciona la Concentración Equivalente de Ruido o el límite de detección mínimo de este sistema con parámetros dados.

En la Figura 6, se puede ver que la Concentración Equivalente de Ruido (CER) se estimó en 80 mM, lo que es mejor que el sistema basado en sondas. Aunque hay filtros en el cabezal de la sonda del sistema basado en la sonda, habría una pérdida de inserción en el cabezal de la sonda debido a la falta de coincidencia de rendimiento (Etendue) entre el

cabezal de la sonda y la fibra de recogida, lo que da como resultado en la reducción de la sensibilidad del sistema. Existe una compensación entre la eficiencia de recogida neta del sistema y el fondo fluorescente. En el dispositivo de la invención, la ausencia de filtros en la punta de la fibra da como resultado un aumento del fondo fluorescente. Sin embargo, dado que la señal Raman se está recolectando directamente a la fibra de la colección, no hay desajuste de rendimiento. Se puede ver en el cálculo de la CER que, aunque el fondo fluorescente es alto, el límite de detección mínimo es mejor en comparación con el sistema basado en sonda convencional.

La Figura 7 muestra el dispositivo de la Figura 1 integrado con un microrreactor 24 serpentino. Esta disposición permite monitorizar la dinámica de una reacción química utilizando técnicas Raman. El microrreactor serpentino 24 está diseñado para una reacción binaria. Como ejemplo específico, el microrreactor serpentino 24 tiene un canal microfluídico de sección transversal rectangular con un ancho de 150 μm y una altura de 60 μm . La región serpentina se ensancha en un canal microfluídico con una sección transversal circular con un diámetro de 250 μm . Este canal está unido al canal microfluídico 16 del dispositivo Raman localizado 10 de la Figura 1. Los reactivos se introducen a través de dos o más entradas y entran al microrreactor serpentino. Después de que se haya producido la reacción en el microrreactor 24, el analito fluye hacia el canal microfluídico 16 del dispositivo localizado de la Figura 1 donde se realizan las mediciones Raman. El volumen total de la región de mezcla 22, desde la unión donde los reactivos comienzan a mezclarse hasta la región de detección de Raman, fue de 8,83 μl .

La esterificación catalizada por ácido de etanol con anhídrido acético para producir acetato de etilo se eligió un modelo de reacción a monitorizar utilizando la disposición de la Figura 7. Se usó ácido sulfúrico como catalizador para la reacción, una cantidad diminuta de la cual se añadió a los reactivos antes de la reacción. Todos los reactivos utilizados (Sigma Aldrich) fueron de calidad de reactivo ACS. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente $\sim 22^\circ\text{C}$. Las soluciones se bombearon en el microrreactor utilizando bombas de jeringa (Aparato Harvard). La relación estequiométrica de anhídrido acético y etanol es 1:2, lo que sería de 1:3,24 en volumen. La relación de los caudales de los reactivos se fijó en 1:4, ya que el etanol era el disolvente transportador. La dinámica de la reacción química se estudió a diferentes caudales del analito.

Se estudió el progreso de la reacción en diferentes escalas de tiempo de interacción. Al cambiar la velocidad de flujo total, se varió el tiempo de interacción para los dos reactivos. El tiempo de interacción fue la duración del flujo del analito desde la unión "T", donde se combinaron los analitos, hasta la región de detección Raman. Antes del experimento real, los espectros puros de los reactivos (anhídrido acético y etanol) y el producto (acetato de etilo) se obtuvieron usando el dispositivo de la Figura 1 y se compararon con los espectros de analito para una reacción incompleta como se muestra en la Figura 8 (a). Como el analito del producto tenía una reacción incompleta, se podían ver los picos de Raman correspondientes a todos los reactivos y productos. Los espectros Raman que se muestran en la Figura 8 (a) se suavizaron utilizando el filtro de suavizado Savitzky-Golay y se aplicaron en la línea base utilizando un ajuste polinómico modificado iterativo. A partir de los espectros, está claro que el pico de Raman a 671 cm^{-1} para anhídrido acético y el pico de Raman a 636 cm^{-1} para acetato de etilo serían dos picos representativos que monitorizar para estudiar el progreso de la reacción química en el microrreactor. La concentración de etanol no se controló, ya que era el disolvente transportador. El caudal total del analito se varió para cambiar el tiempo de interacción de los reactivos. Los espectros Raman del analito se obtuvieron utilizando WLRs con un tiempo de adquisición de 2 s.

La Figura 8 (b) muestra la variación en la concentración de acetato de etilo y anhídrido acético con respecto al cambio en el caudal. Cada punto de datos es un promedio de 40 espectros Raman. El suavizado de Savitzky-Golay se realizó en los espectros Raman como una etapa de procesamiento posterior antes de estimar el valor de intensidad de pico. A bajos caudales, la reacción se completó dentro del tiempo de interacción y los picos correspondientes al anhídrido acético faltaban en los espectros de Raman registrados. Sin embargo, para caudales más altos, la reacción fue incompleta, de modo que el pico de anhídrido acético era visible en los espectros Raman y la intensidad del pico correspondiente al acetato de etilo disminuyó. Los espectros registrados estaban completamente libres de cualquier fondo del sustrato del chip de microfluidos y no hubo ningún requisito de alineación óptica durante el experimento.

El dispositivo 10 de la invención puede incorporarse en numerosos sistemas y disposiciones de microfluídicos. La figura 9 muestra otro ejemplo. En el presente documento, el dispositivo de la Figura 1 se incorpora con un sistema microfluídico basado en microgotas. Hay dos geometrías populares para la creación de gotitas de tamaño de nanolitros: la "unión en T" y el "enfoque de flujo". La Figura 9 muestra un diseño de unión en T simple donde la muestra y un tampón de aceite se encuentran en ángulos rectos para la formación de gotas, como se muestra en la Figura 9 (b). Cuando las dos fases inmiscibles se encuentran en la unión, el flujo de aceite ejerce una fuerza de corte en el flujo de la muestra, lo que hace que se rompa en microgotas discretas. Al ajustar los flujos relativos de las dos fases inmiscibles, se pueden formar gotitas de varios tamaños a partir de un solo chip de microfluidos como se muestra en la Figura 9 (c).

Para probar la disposición de la Figura 9, se preparó un sistema en el que la región de generación de gotitas en el chip de microfluidos tenía una sección transversal rectangular con un ancho de 100 μm y una altura de 50 μm . Más abajo, el canal microfluídico se ensanchó en un canal con una sección transversal circular de 250 μm de diámetro, donde se recogieron los espectros Raman. Se utilizó etanol diluido al 50 % utilizando agua desionizada como muestra. Se crearon gotitas de etanol dentro de una fase continua de aceite de silicona (Sigma Aldrich) que contenía el agente tensioactivo Span 85 (Fluka) mezclado en una relación de volumen de 9,7:0,3.

Se tomaron imágenes de las gotitas usando una cámara de alta velocidad (Fastec Troubleshooter) a 250 cuadros por segundo en tres regiones de interés: la unión en T, corriente abajo y en la región de detección de Raman (Figura 9 [b], [c], [d] respectivamente). El volumen de la gota se calculó aproximando su forma dentro del canal redondo a un cilindro y dos elipsoides parciales que representan la "cabeza" y la "cola" curvadas. A una relación de flujo de 1:1 y caudales de 120 $\mu\text{l} / \text{h}$, el volumen de la gota fue de $\sim 18,5 \text{ nl}$. Los espectros Raman se recolectaron durante un tiempo de adquisición de 1 s, lo que equivale a 1,8 gotitas que pasan a través de la región de detección por adquisición.

La Figura 10 muestra los espectros Raman recopilados del sistema de la Figura 9 con un tiempo de adquisición de 1 s, así como los espectros puros de aceite y etanol. Los espectros se suavizaron utilizando un polinomio de Savitzky - Golay y se utilizaron como referencia. Se puede ver que el pico principal en los espectros Raman del etanol es claramente visible en los espectros junto con los picos para el aceite. Para los caudales utilizados, durante un período de 1 s, 1,8 gotitas pasaron a través de la región de análisis Raman. Sin embargo, es posible reducir aún más el tiempo de adquisición. Por lo tanto, en principio, sería posible utilizar el dispositivo de la invención para sondear una única gota en un sistema microfluidico basado en microgotas. Este esquema de detección podría incorporarse fácilmente en cualquier sistema de microgotas para investigar y estudiar diversas dinámicas químicas y físicas.

El dispositivo de la invención tiene numerosas ventajas, lo que lo hace adecuado para muchas aplicaciones que hasta la fecha no han sido comercialmente prácticas. Por ejemplo, el dispositivo se puede utilizar para capturar y analizar señales Raman de bebidas alcohólicas. En particular, se han investigado varias marcas diferentes de whiskies escoceses. Se obtuvieron espectros Raman de estas muestras de whisky y se utilizaron varias técnicas multivariadas para lograr la predicción de la concentración y las clasificaciones de diferentes tipos de whisky escocés. Se realizó una calibración de mínimos cuadrados parciales (PLS) para obtener la concentración de varias marcas de whisky. Además, el análisis de componentes principales (PCA) se utilizó para clasificar varias marcas según el sabor, la edad y el barril.

Para las pruebas de whisky, el chip de microfluidos se fabricó en PDMS utilizando una litografía suave con canales de inserción de fibra predefinidos. Dos fibras ópticas multimodo de ultra bajo OH con un tamaño de núcleo de 200 μm (Polymicro Technologies) se integraron en el chip para la excitación y la recogida de señales Raman. Las muestras de whisky se cargaron directamente en el chip de microfluidos sin ninguna etapa especial de preparación de la muestra. Se colocó una gota de whisky de 20 μl de volumen en la entrada de la muestra utilizando una micropipeta. Esta muestra se succionó después en el canal microfluidico usando una jeringa de 1 ml unida a la salida del chip de microfluidos. Una vez que la muestra fue absorbida en la región de detección de señal, los espectros Raman de la muestra se adquirieron con un tiempo de adquisición de 2 s.

Una vez completada la adquisición, cualquier muestra restante en la entrada de la muestra se eliminó y se colocaron 40 μl de agua desionizada en la entrada de la muestra, que se pasó a través del canal microfluidico para aclarar el sistema. Se aseguró que el procedimiento de aclarado fuera suficiente para evitar cualquier contaminación cruzada mientras se adquirían espectros de diferentes muestras. Después del procedimiento de aclarado, el chip estaba listo para usar con una nueva muestra. Con un tiempo de adquisición de 2 s, el tiempo total requerido para adquirir un espectro Raman de la muestra fue inferior a 1 minuto, incluido el procedimiento de carga de la muestra como se describe.

La excitación Raman se realizó con 200 mW de potencia de láser acoplada a una fibra de excitación multimodo a través de un adaptador SMA de un diodo láser (Laser2000 (UK) Ltd., potencia máxima de 450 mW, longitud de onda de 785 nm). El otro extremo de la fibra de recogida acopló los fotones Raman recolectados en un espectrómetro (Shamrock SR-303i, Andor Technology) a través de un sistema telescópico para hacer coincidir el número F de la fibra con el del espectrómetro. El espectrómetro empleó una rejilla de 400 líneas / mm, a 850 nm y estaba equipado con una cámara CCD retroiluminada y de depleción profunda enfriada termoeléctricamente (Newton, Andor Technology) para la detección de la señal Raman.

Se utilizaron seis marcas de whisky escocés disponibles en el mercado y sus variantes en este estudio. Para el experimento de calibración de la concentración de etanol se prepararon muestras de etanol con una concentración conocida en porcentaje de volumen mezclando etanol puro al 100 % (Sigma Aldrich) con agua desionizada. Para evitar el sesgo experimental, dos personas diferentes prepararon cuatro grupos de muestras con una concentración de etanol en un porcentaje de volumen variable del 36 % al 43 % con un tamaño escalón del 1 %. Se adquirieron cinco espectros de cada uno de los grupos para cada concentración con un tiempo de adquisición de 2 s cada uno, dejando 20 espectros correspondientes a cada concentración.

Para los experimentos de clasificación, el fondo fluorescente también se tuvo en cuenta junto con las señales Raman. Para evitar el efecto de fotoblanqueamiento que distorsiona los resultados de la clasificación, los espectros se adquirieron después de asegurarse de que las muestras se fotoblanquearon mediante la irradiación de la muestra con el rayo láser de excitación durante cinco minutos.

Para los experimentos de clasificación, se obtuvieron cuatro grupos de 50 espectros Raman cada uno de un tipo de muestra de whisky fotoblanqueado. También se obtuvo una serie de espectros Raman de muestras no

fotoblanqueadas durante 800 s, con un tiempo de adquisición de 2 s para cada espectro, para clasificar muestras de whisky de la misma marca con diferentes sabores que de otra manera no sería posible clasificar.

Los espectros Raman de las muestras de whisky contienen principalmente los picos correspondientes al etanol, que equivale al 40 % del volumen de la muestra. Los parámetros de adquisición utilizados en este experimento no fueron suficientes para obtener picos específicos correspondientes a los congéneres cuya cantidad es solo inferior al 5 % del volumen total. Sin embargo, estos varían el fondo de fluorescencia de los espectros Raman adquiridos. Esta información cuando se combinó con los picos Raman fue crucial para ayudar en la clasificación de diferentes tipos de whiskies. Esto se explicará con más detalle más adelante.

Se utilizó un modelo PLS para predecir la concentración del contenido de etanol en la muestra de whisky. El modelo se construyó en base a los espectros Raman desde 655 cm^{-1} a 1720 cm^{-1} de muestras con concentración de etanol conocida. Para cada concentración, se utilizaron 20 espectros Raman. Los espectros Raman se suavizaron utilizando un filtro de suavizado Savitzky-Golay y se aplicaron en la línea basal utilizando un ajuste polinómico modificado iterativo (impf) para eliminar el fondo de fluorescencia de los datos. El modelo se validó con un método de validación cruzada "dejar uno fuera" como se muestra en la Figura 11. Cuando se usaron seis parámetros para la predicción, el error de la raíz cuadrada media de la predicción (RMSEP) fue de 1,17 %.

El modelo PLS validado se utilizó para predecir la concentración de etanol de siete tipos de whisky. El modelo podría predecir la concentración de etanol de las muestras de whisky dentro del 1 % del error en la concentración pronosticada en comparación con la concentración de etanol reclamada por los fabricantes en la etiqueta del producto como se muestra en la Figura 12. A partir del resultado de la predicción, está claro que el modelo PLS funciona razonablemente bien para predecir la concentración de etanol de la muestra de whisky. La concentración de etanol es un parámetro importante en la evaluación de la calidad del whisky. La concentración de etanol debe ser superior al 40 % para las muestras de whisky auténticas. Por lo tanto, esta técnica calibrada se puede utilizar para la detección rápida de muestras de whisky falsificadas.

Aunque los espectros Raman de whisky adquiridos contienen solo los picos Raman correspondientes al etanol, el fondo fluorescente en los espectros Raman adquiridos fue diferente para diferentes tipos de muestras de whisky. Esto puede deberse a la contribución variable de los componentes de congéneres que son responsables del color del whisky. Para la predicción de la concentración de etanol, el fondo de fluorescencia de los espectros Raman adquiridos se descartó realizando una resta basal en los datos. Sin embargo, la información del fondo fluorescente resultó útil para clasificar diferentes tipos de whiskies. Por lo tanto, para la clasificación de las muestras de whisky, se realizó un PCA con los datos Raman adquiridos justo después del suavizado Savitzky-Golay.

Hay varios tipos de clasificaciones propuestas para el whisky escocés de malta única según el sabor, la ubicación geográfica del origen, la edad, el barril, etc. Se utilizó el análisis multivariado basado en PCA para agrupar los espectros Raman obtenidos de diferentes tipos de muestras de whisky. Se agruparon diferentes marcas de whisky y el resultado se comparó con una clasificación popular de whisky de malta única basado en sus características aromáticas. Varias marcas de whiskies escoceses se clasificaron en diez grupos en esta clasificación. Hay una transición suave en la calidad de los whiskies de A a J. Esto significa que las características aromáticas de las marcas en el grupo A y en el grupo B serían similares y la del grupo A y el grupo J serían muy diferentes. Se aplicó un PCA a los espectros Raman adquiridos de cinco marcas de whisky de diez años. Después de realizar el PCA, los datos se representaron en una gráfica del componente principal 1 (PC1) frente al componente principal 2 (PC2) como se muestra en la Figura 13. Las muestras utilizadas procedían de los grupos A, B, H, I y J. Se observó que cada muestra formaba un grupo distinguible entre sí. Asimismo, las muestras que corresponden a los grupos H, I y J estaban más cerca cuando se comparan con las muestras que corresponden a A y B. Esto muestra que los espectros adquiridos muestran una tendencia a la agrupación basada en la característica aromática de la muestra de whisky.

Otro criterio clave para clasificar el whisky es su edad. El proceso de envejecimiento cambia el perfil del congéner y el color de las muestras de whisky. Se aplicó un PCA a los espectros Raman obtenidos de tres muestras de whisky de la misma marca ("Glenfiddich") con diferentes edades. Como puede verse en la Figura 14, los espectros Raman de las muestras correspondientes a diferentes edades son claramente distintos unos de otros.

También se investigó la clasificación de las muestras de whisky según su barril. Se eligieron cuatro tipos de "Glenmorangie" de 10 años y el whisky se mantuvo en un barril diferente durante los últimos dos años del proceso de maduración. La diferencia en el barril también altera el perfil del congéner. La agrupación se realizó como se ha explicado anteriormente y los resultados que se muestran en la Figura 15 muestran una clara distinción entre la gráfica PC1 frente a PC2.

Otro conjunto de muestras de la misma marca ("Bruichladdich") con diferentes características aromáticas se clasificó como se muestra en la Figura 16. Se puede ver que "Links" y "Peat" no se distinguen utilizando el agrupamiento según el PCA. Esto significa que la información de los espectros Raman y el fondo fluorescente no fue suficiente para distinguir entre estos dos tipos de whiskies. Una solución a este problema fue utilizar la información sobre la tasa de fotoblanqueamiento para distinguir entre estas muestras en particular. Para obtener esta información, se adquirió una serie de espectros Raman con un tiempo de adquisición de 2 s durante 800 segundos cada uno para cada muestra.

La desintegración de la fluorescencia debido al fotoblanqueamiento se obtuvo trazando el nivel de señal promedio en la región entre 740 cm^{-1} y 750 cm^{-1} , donde no había un pico Raman. La curva obtenida se ajustó a un solo exponencial de desintegración para obtener la constante de desintegración como se muestra en la Figura 17. Se puede ver que la constante de desintegración correspondiente a "Links" es un orden mayor que la de "Peat". Cuando se comparó con los procedimientos anteriores, la detección de muestras fue posible con la adquisición 2s, la obtención de la constante de desintegración requiere mucho tiempo (con un tiempo de adquisición requerido de ~ 6 minutos). Sin embargo, esto proporciona información adicional que puede ayudar a lograr la clasificación.

La presente invención proporciona un dispositivo optofluídico completamente libre de alineación para el análisis de whisky escocés. Al aprovechar las ventajas de los optofluídicos, la presente invención ofrece portabilidad y detección rápida de analito con un tiempo de adquisición relativamente bajo (2 s) con un volumen de muestra requerido muy bajo (20 μl). En este dispositivo, las muestras se pueden analizar sin ninguna etapa especial de preparación de muestras. Adicionalmente, la combinación de espectros Raman y la información de fondo fluorescente se puede utilizar para clasificar diferentes tipos de whiskies utilizando PCA. Se logró la clasificación de los whiskies en función de sus características aromáticas, la edad y el barril. También se demostró que la constante de desintegración de la fluorescencia también se puede usar como otro parámetro para distinguir los tipos de whisky que de otra forma no se pueden distinguir, aunque esto requería un tiempo de adquisición más largo. El resultado muestra que esta sonda Raman optofluídica es adecuada para el desarrollo de dispositivos portátiles para autenticar bebidas alcohólicas. El bajo tiempo de adquisición también ofrece el desarrollo de dispositivos para la monitorización del procesos en línea en líneas de producción de licores.

El dispositivo de la presente invención usa guías de ondas integradas en un chip microfluídico para medir señales Raman. Este dispositivo es escalable y fácilmente adaptable a varias arquitecturas microfluídicas y permite la adquisición rápida y sin alineación de espectros Raman de analitos sin ningún fondo del sustrato del chip microfluídico. El haz divergente utilizado para la excitación Raman permite maximizar el volumen de muestreo en el canal microfluídico. El dispositivo permite la detección sensible de analitos con una preparación mínima de la muestra. El límite de detección mínimo de este dispositivo para que este dispositivo detecte urea se estimó en 80 mM durante un tiempo de adquisición de 5 segundos con una potencia de excitación de 200 mW, que es mejor que su homólogo por sondas. Asimismo, el dispositivo podría combinarse fácilmente con otros diseños microfluídicos para ampliar su funcionalidad. El diseño simple y robusto del dispositivo de la invención abre el camino para que la espectroscopia Raman se convierta en un método práctico y deseable de detección de analitos en microfluídica.

Un experto apreciará que son posibles variaciones de las disposiciones desveladas sin apartarse de la invención. Por ejemplo, la guía de onda de excitación y / o la guía de onda de recogida pueden estar recubiertas con un material ópticamente activo. En particular, el extremo de la guía de onda de excitación y / o la guía de onda de recogida puede recubrirse con un material de filtro. En el caso de la guía de onda de excitación, el material de filtro puede seleccionarse para permitir solo la longitud de onda de excitación. En el caso de la guía de onda de recogida, el material de filtro puede seleccionarse para bloquear la longitud de onda de excitación. Además, el extremo de al menos una de la guía de onda de excitación y / o la guía de onda de recogida puede tener forma. Por consiguiente, la descripción anterior de la realización específica se hace únicamente a modo de ejemplo y no con fines limitativos. Estará claro para el experto que se pueden hacer modificaciones menores sin cambios significativos en la operación descrita.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo de detección espectroscópica Raman (10) que comprende al menos un canal de muestra microfluídico (16); al menos una guía de onda de excitación (12) para excitar una señal Raman y al menos una guía de onda de recogida (14) para recoger una señal Raman, en el que
- 10 la al menos una guía de onda de excitación (12) está colocada de forma que su extremo de salida está en el canal de muestras (16) y la al menos una guía de onda de recogida (14) está colocada de forma que su extremo de entrada está en el al menos un canal de muestras (16),
no hay elementos ópticos entre el extremo de la guía de onda de excitación (12) y el canal de muestras (16) para modificar el perfil del haz de salida de la guía de onda de excitación (12) y / o no hay elementos ópticos entre el extremo de la guía de onda de recogida (14) y el canal de muestras (16) y la guía de onda de excitación (12) y la guía de onda de recogida (14) son mutuamente ortogonales.
- 15 2. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la guía de onda de recogida (14) y / o la guía de onda de excitación (12) es una fibra óptica, por ejemplo, una fibra óptica multimodo.
- 20 3. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la guía de onda de excitación (12) y / o la guía de onda de recogida (14) están incrustadas en el dispositivo.
- 25 4. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la distancia entre el extremo de la guía de onda de excitación (12) y el extremo de la guía de onda de recogida (14) es del orden del tamaño del núcleo de cada guía de onda.
- 30 5. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el canal de muestras (16) es al menos parte de un canal microfluídico que permite que el fluido fluya a través del mismo, opcionalmente en el que se proporcionan medios para provocar un flujo de fluido a través del canal microfluídico.
- 35 6. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los extremos de la guía de onda de excitación (12) y la guía de onda de recogida (14) definen el volumen de detección de muestras.
- 40 7. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el haz de excitación divergente o colimado muestrea sustancialmente toda la sección transversal del canal de muestras (16).
- 45 8. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes integrado con uno o más dispositivos microfluídicos funcionales, opcionalmente en el que el dispositivo microfluídico funcional comprende un dispositivo microfluídico adaptado para generar microgotas y / o un microrreactor para permitir que se produzcan una o más reacciones dentro del dispositivo.
- 50 9. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el canal de muestras (16) y uno de la guía de onda de excitación (12) y la guía de onda de recogida (14) están dispuestos en una configuración en T.
- 55 10. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tamaño del canal de muestras (16) es $<500 \mu\text{m}$ y / o en el que el canal de muestras (16), la guía de onda de excitación (12) y la guía de onda de recogida (14) tienen sustancialmente las mismas dimensiones periféricas.
- 60 11. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el canal de muestras (16), la guía de onda de excitación (12) y la guía de onda de recogida (14) están dispuestos en una configuración cruzada, opcionalmente en la extremo de la guía de onda de excitación (12) y / o la guía de onda de recogida (14) están recubiertos con un material ópticamente activo o en el que el extremo de la guía de onda de excitación (12) y / o la guía de onda de recogida (14) está recubierto con un material de filtro.
12. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el extremo de al menos una de la guías de onda de excitación (12) y / o la guía de onda de recogida (14) está tratado y / o conformado.
13. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la señal de excitación provoca fluorescencia, así como una señal Raman, y la guía de onda de recogida (14) recoge la señal de fluorescencia así como la señal Raman.

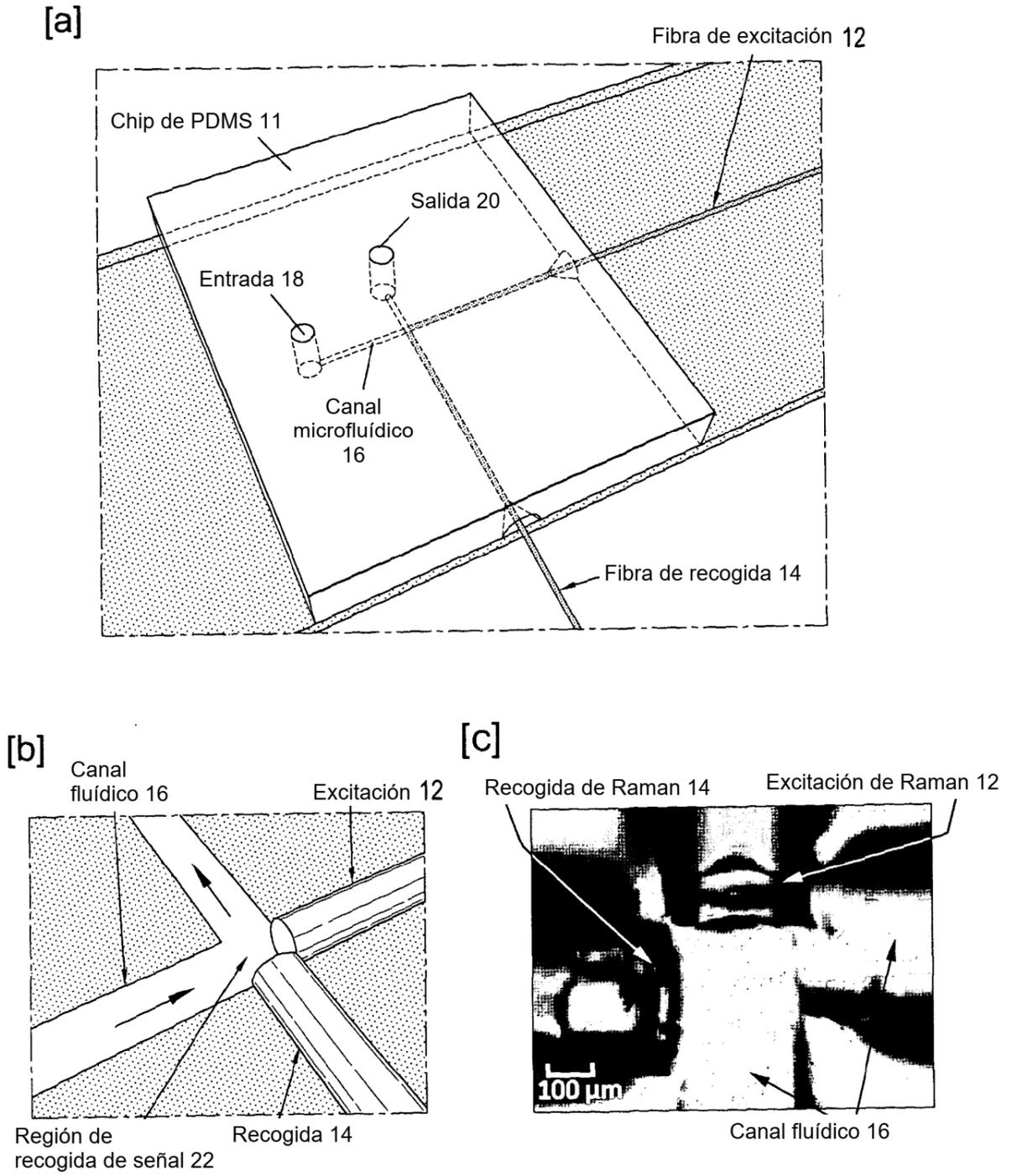


Figura 1

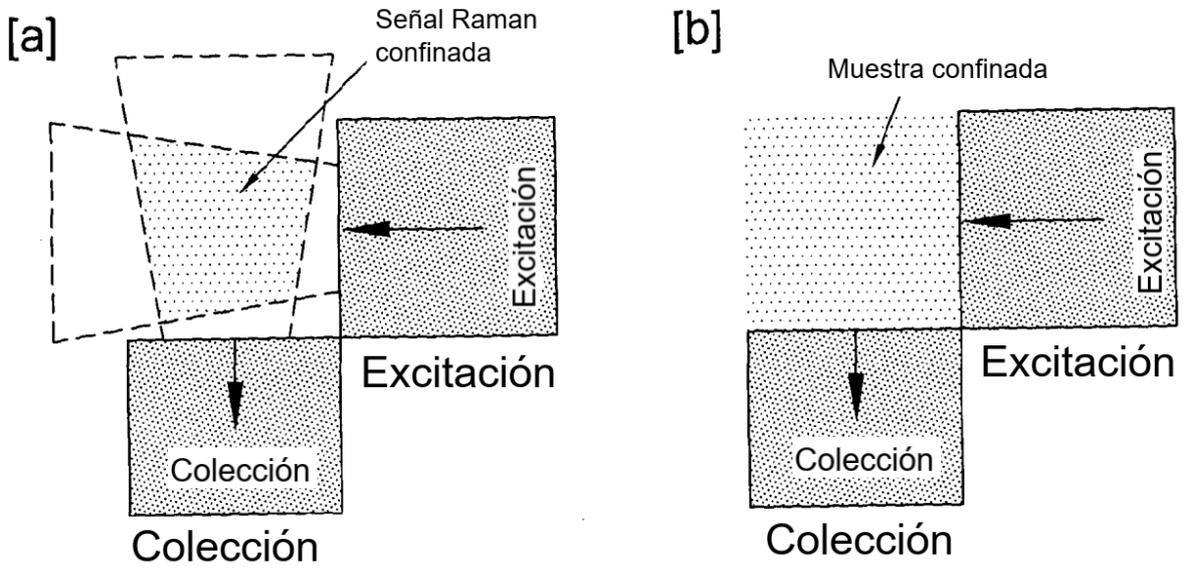


Figura 2

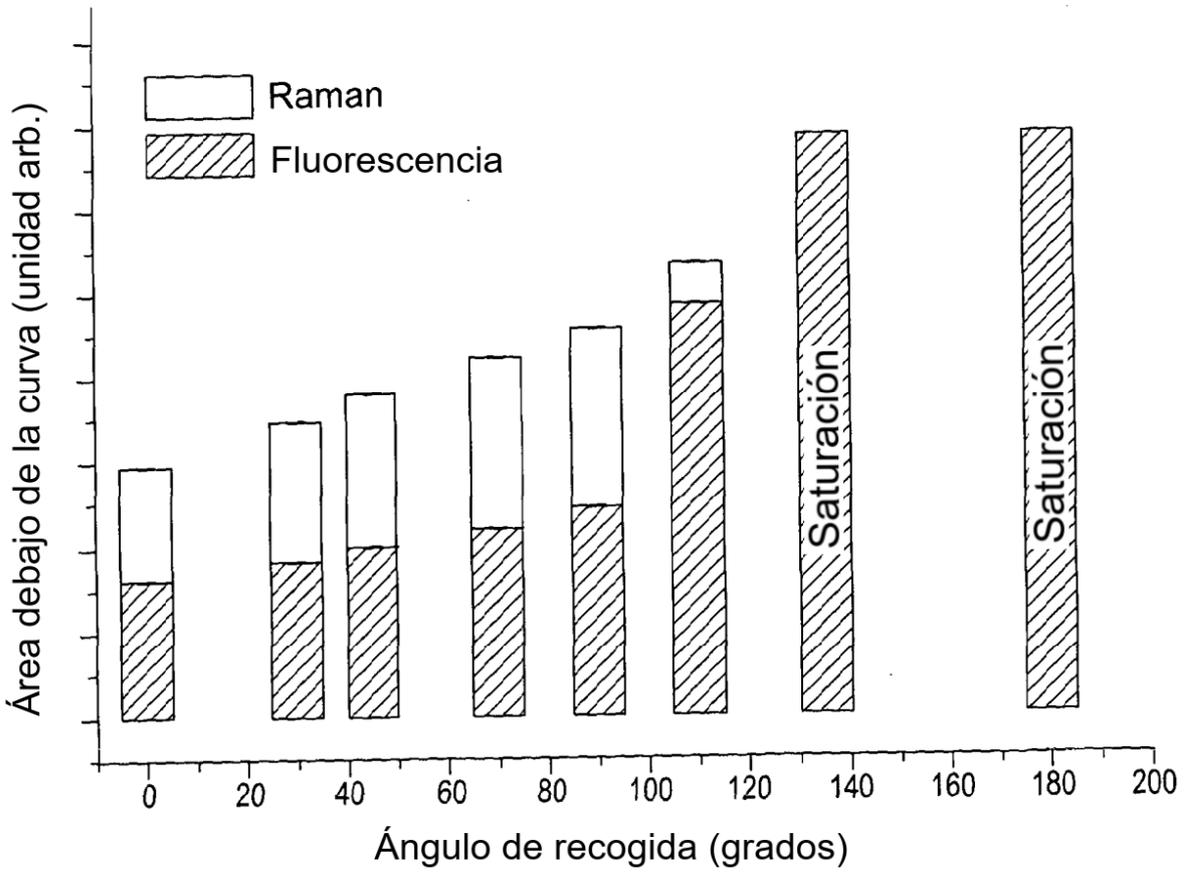


Figura 3

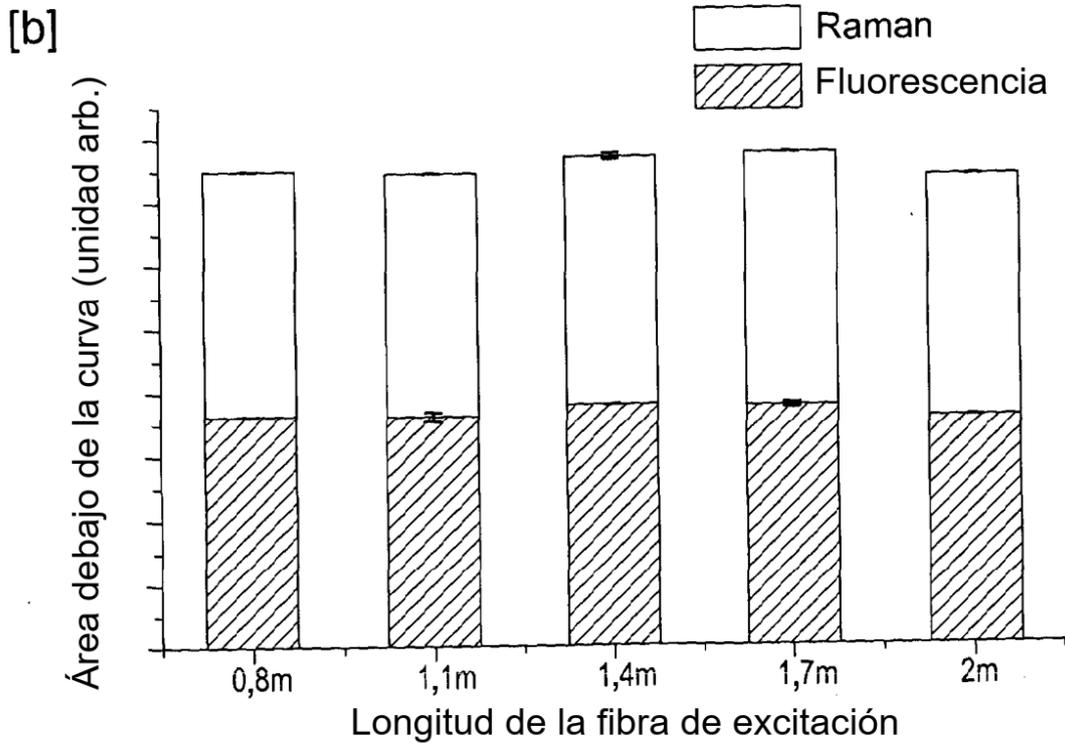
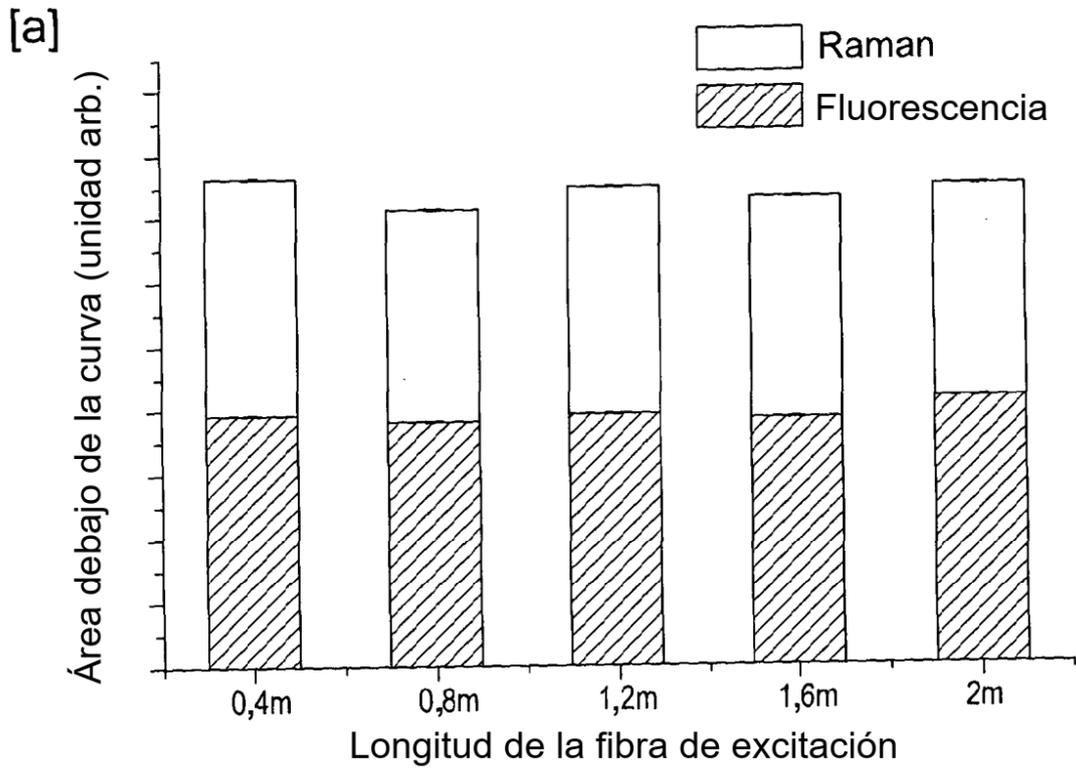


Figura 4

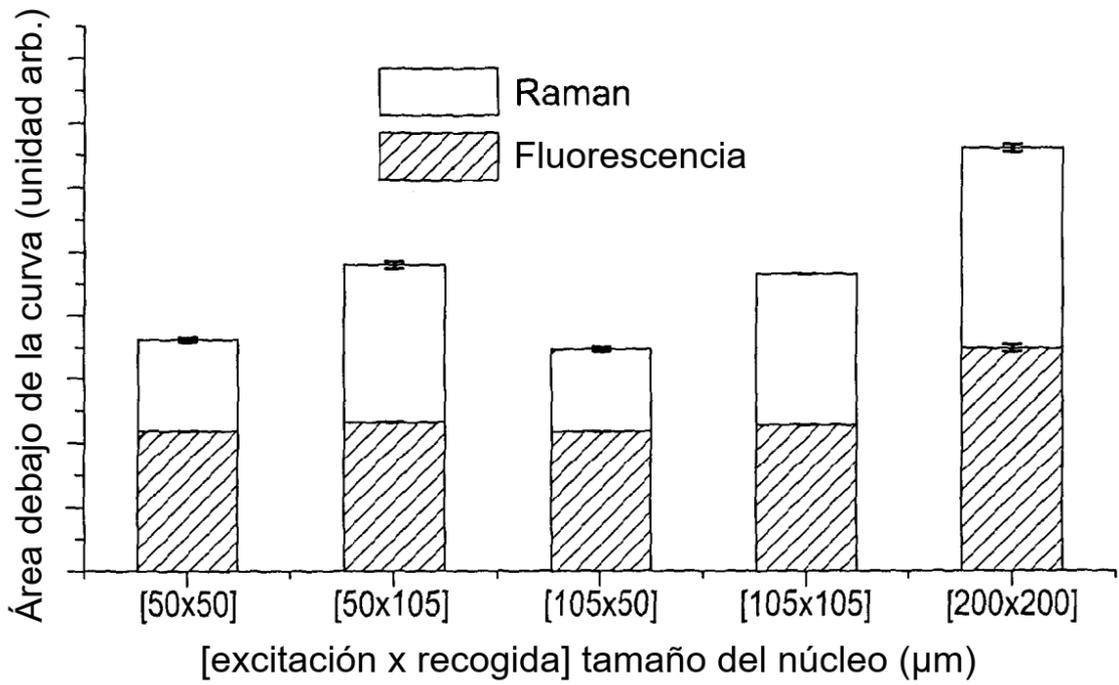


Figura 5

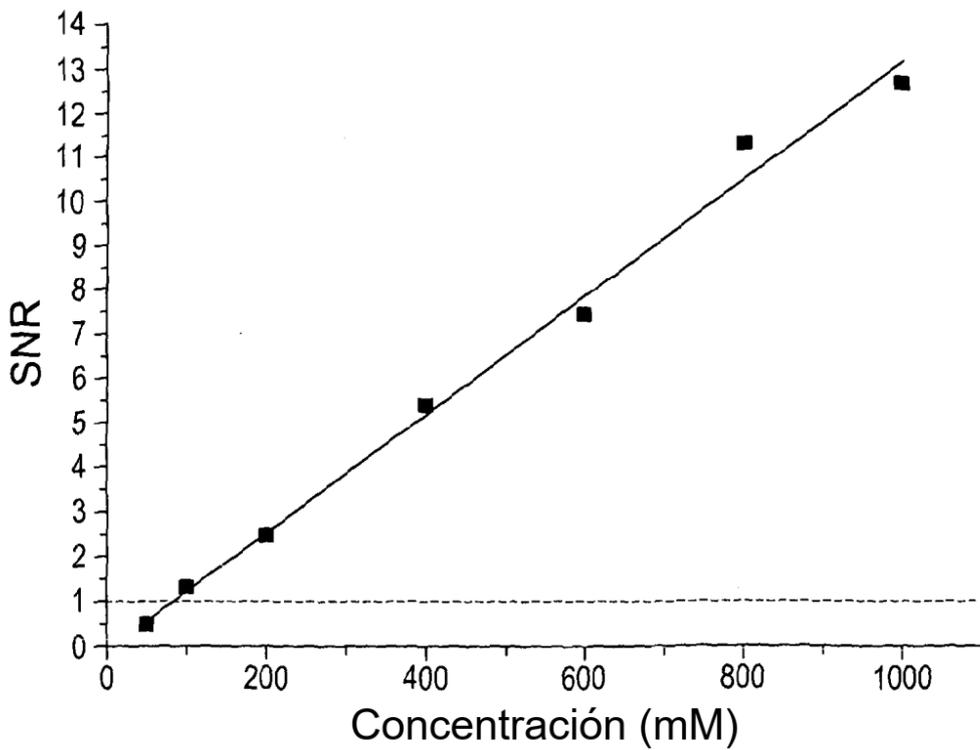


Figura 6

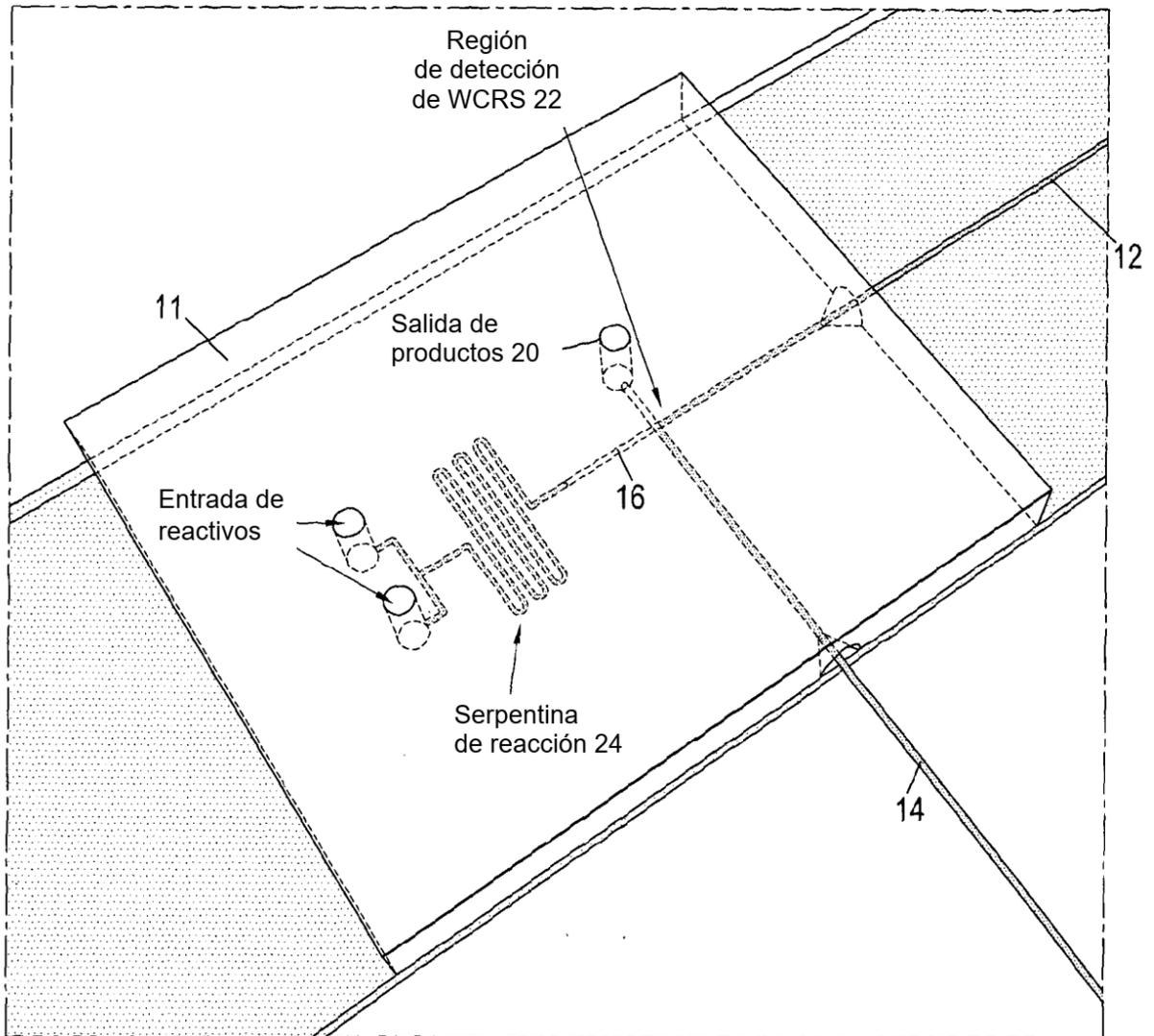
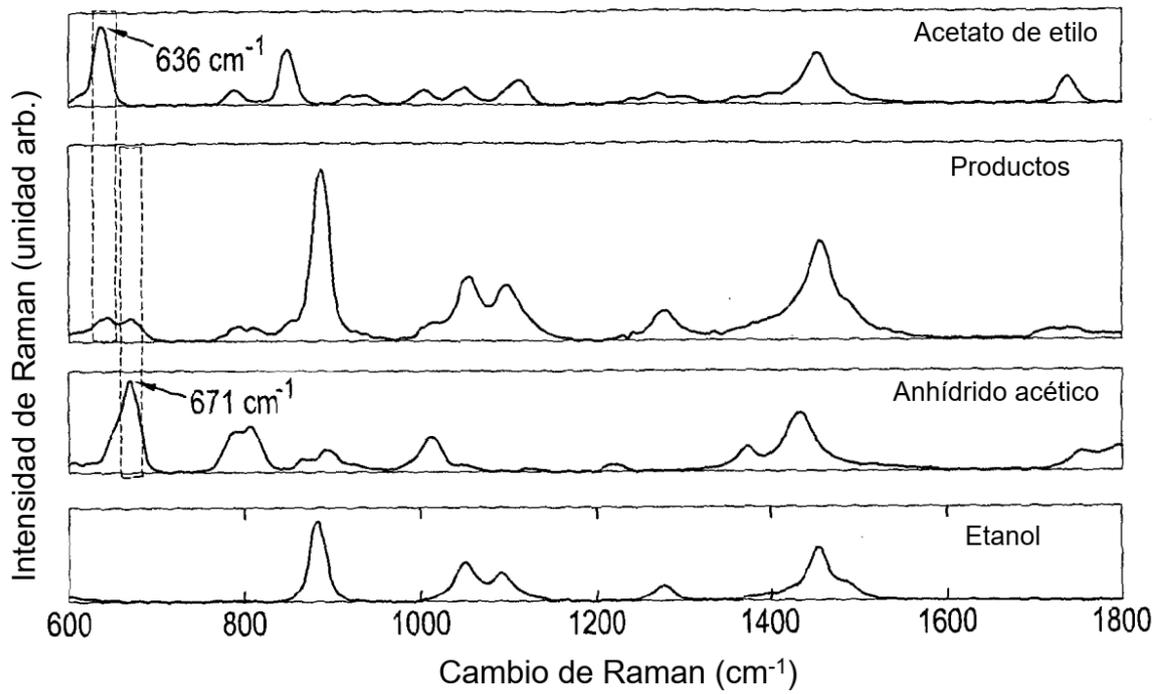


Figura 7

[a]



[b]

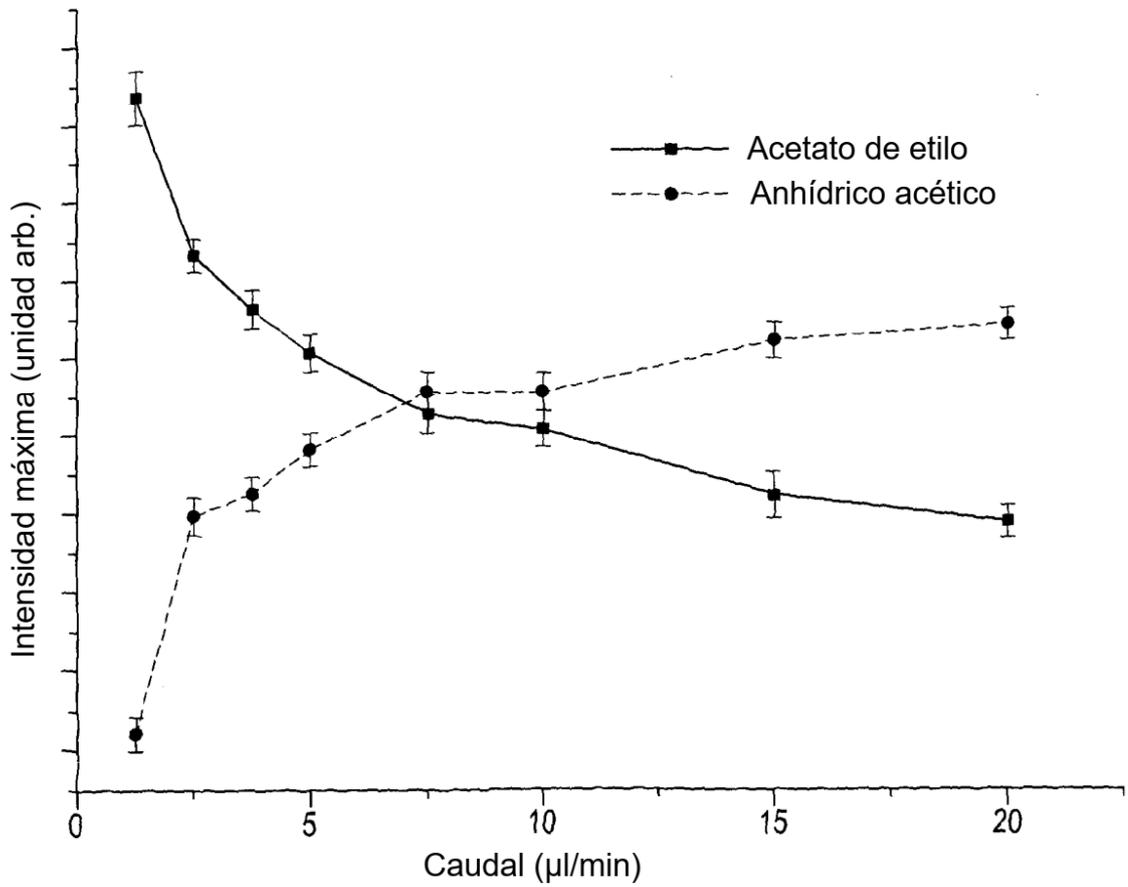


Figura 8

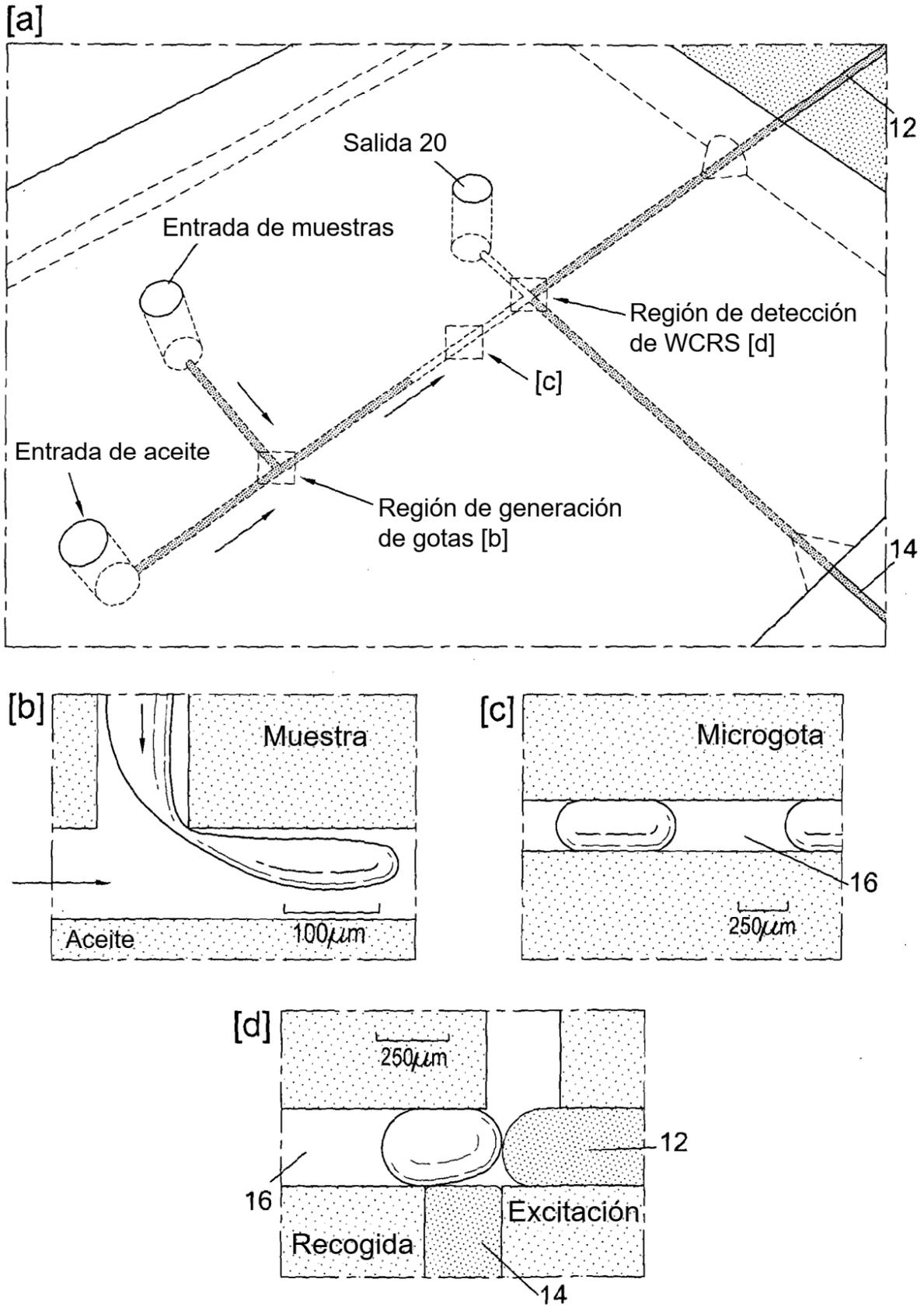


Figura 9

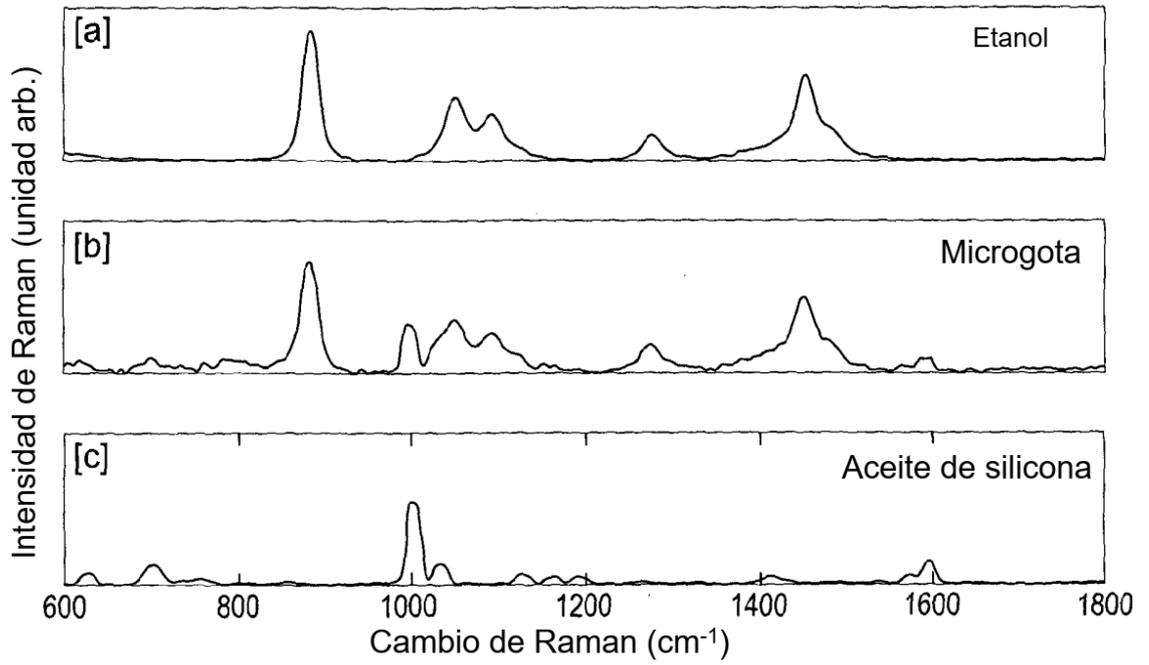


Figura 10

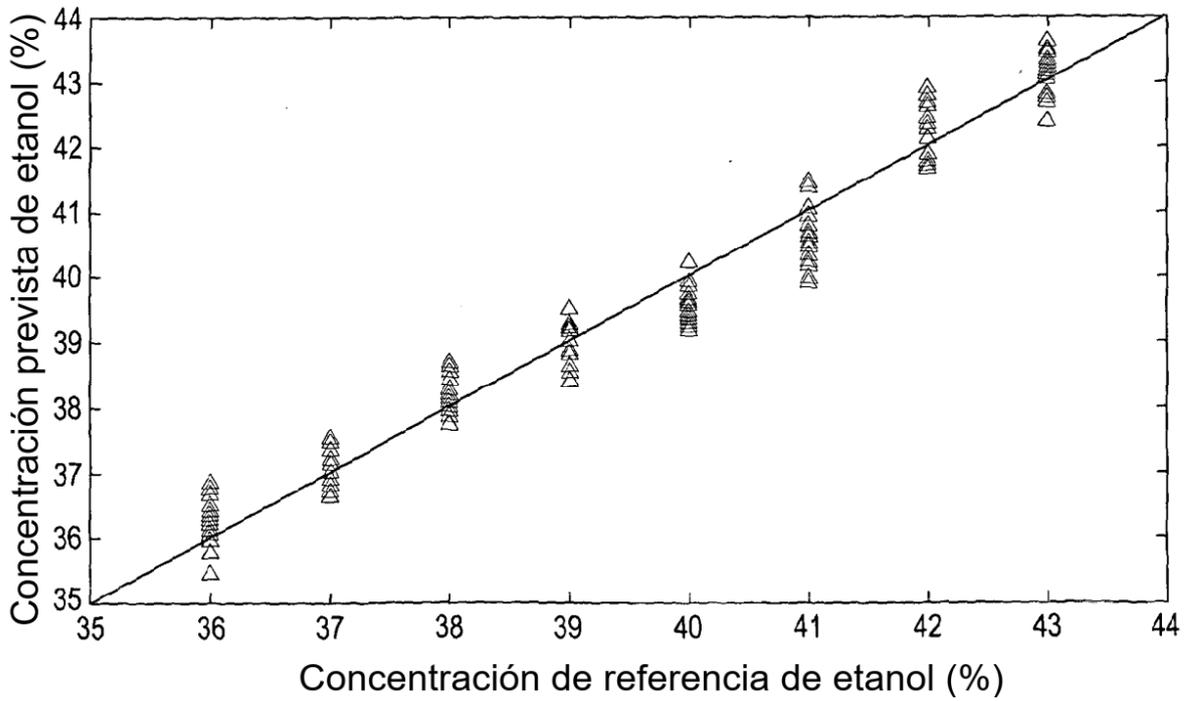


Figura 11

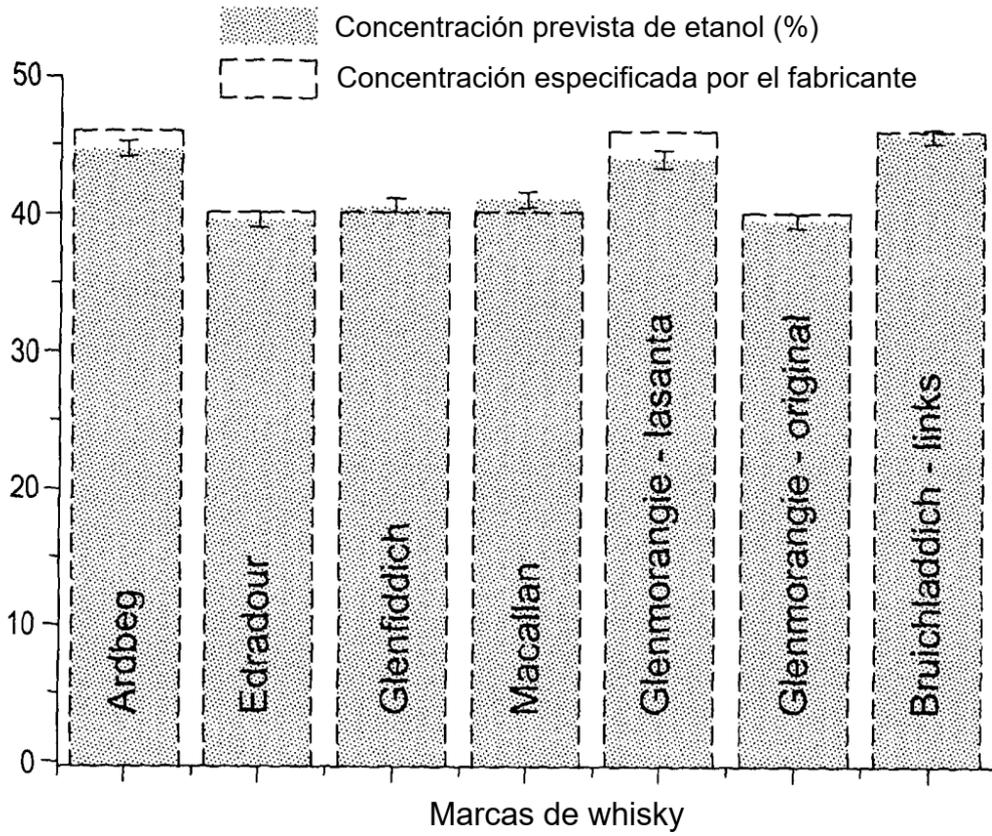


Figura 12

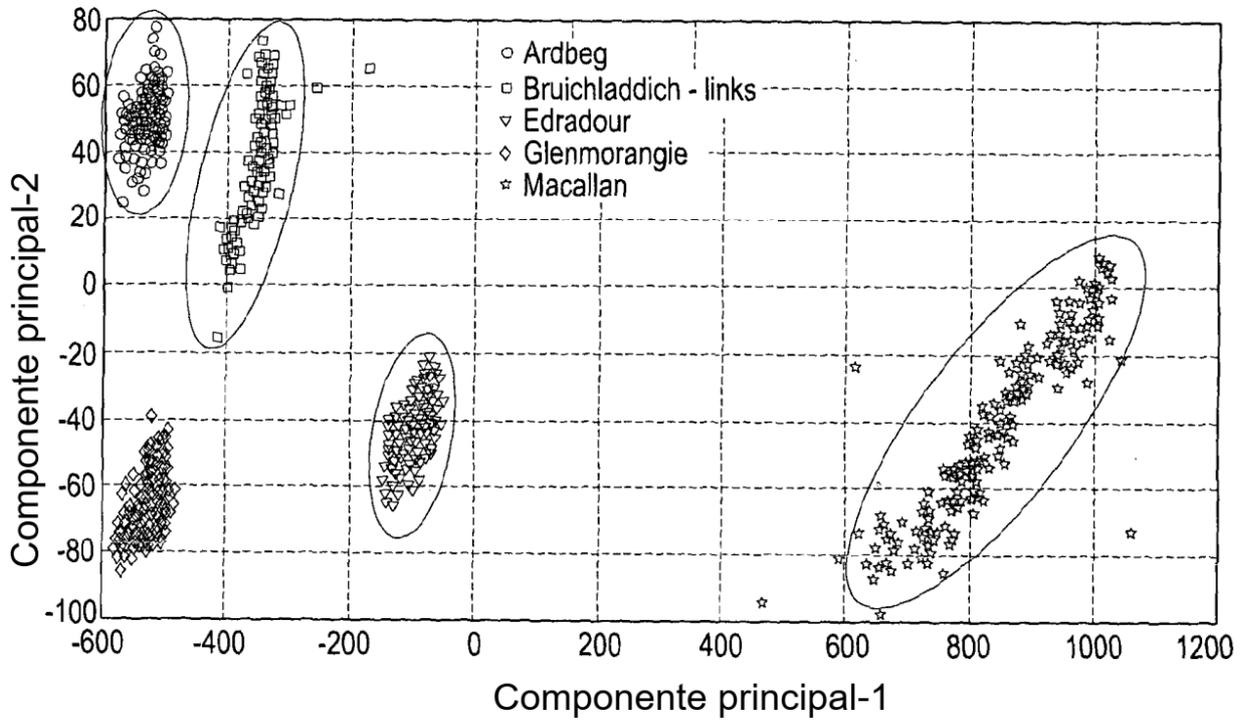


Figura 13

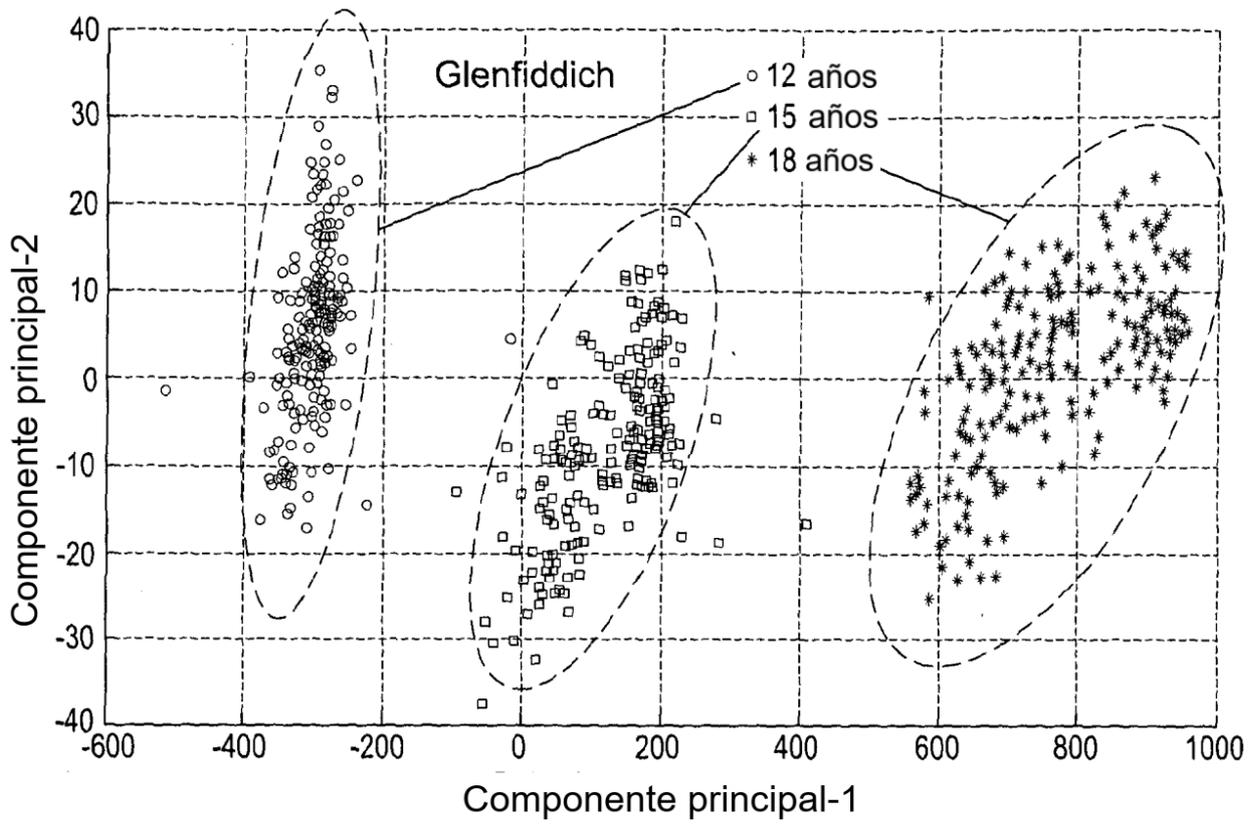


Figura 14

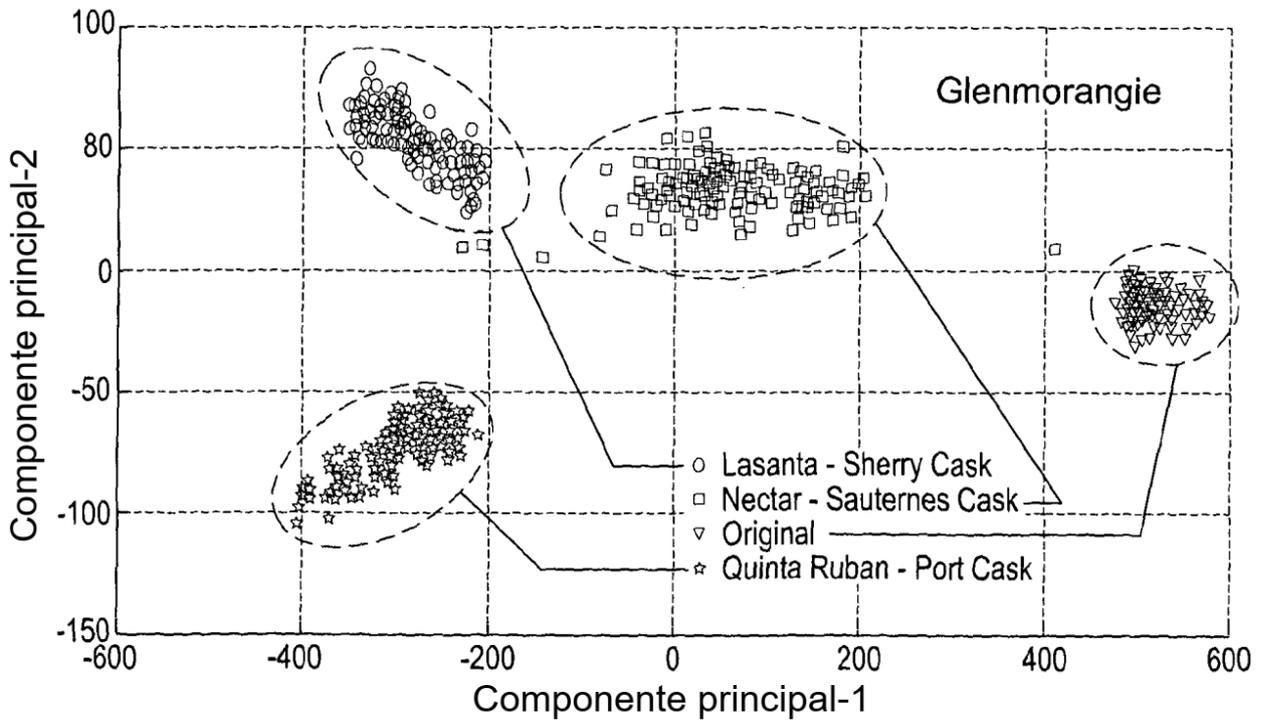


Figura 15

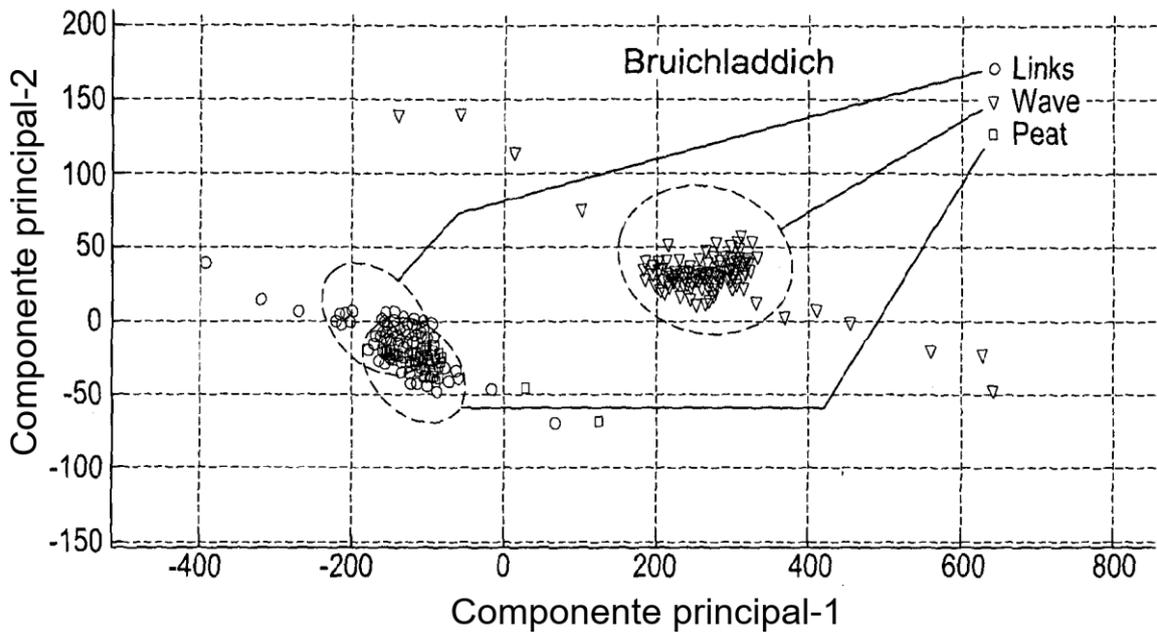


Figura 16

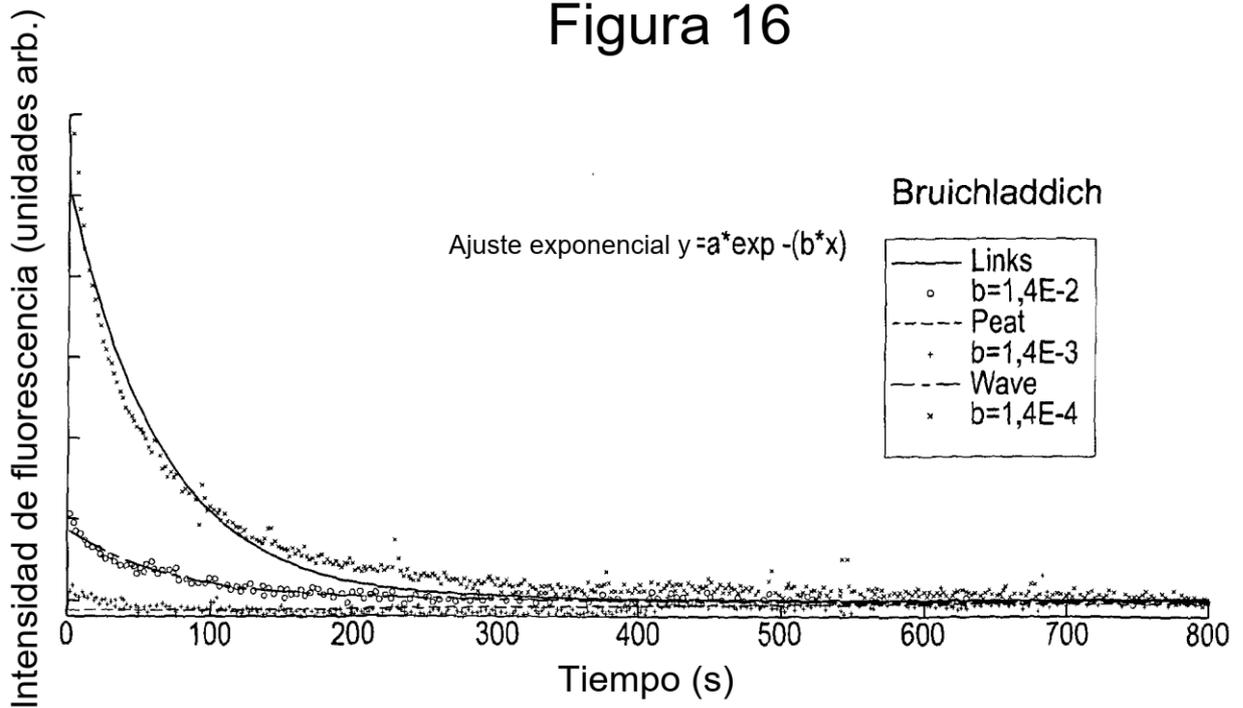


Figura 17