



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 062**

51 Int. Cl.:
G01N 35/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98930662 .6**

86 Fecha de presentación : **03.07.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **0993618**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.04.2000**

54 Título: **Método y aparato para determinar el contenido de un componente en una muestra de fluido.**

30 Prioridad: **04.07.1997 DK 810/97**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **FOSS Analytical A/S
Slangerupgade 69, P.O. Box 260
3400 Hilleroed, DK**

72 Inventor/es: **Aegidius, Poul Erik**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 283 062 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

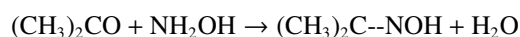
Método y aparato para determinar el contenido de un componente en una muestra de fluido.

5 La presente invención se refiere a un método según se describe en el preámbulo de la reivindicación 1. La invención se refiere además a un aparato, según se describe en el preámbulo de la reivindicación 18, para llevar a cabo el método. Además, la invención se refiere a una celda de difusión y una celda de medición destinadas a usarse en el aparato. La invención es útil específicamente para la determinación del contenido de acetona en leche.

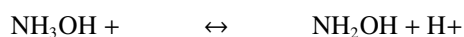
10 **Técnica anterior**

Desde hace tiempo ha sido deseable medir el contenido de acetona en leche para disponer de un instrumento de detección precoz de la cetosis (una enfermedad metabólica) en las vacas lecheras. De hecho hay métodos disponibles para tal determinación, pero en general precisan mucho tiempo.

15 Peter Marstorp ha descrito en *Analytica Chimica Acta*, 149 (1983) pp. 281-289, un método como el mencionado más arriba y más específicamente un método de inyección en flujo para la determinación de acetona en leche. Las muestras de leche que puedan tener algún contenido de acetona se inyectan en una corriente portadora. La acetona se separa de la muestra de leche por difusión gaseosa a través de una membrana de Teflón. La acetona presente en la corriente reactiva situada en el lado aceptor de la membrana puede detectarse por espectrofotometría o colorimetría. En la corriente reactiva la acetona CH_3COCH_3 reacciona con hidroxilamina NH_2OH formando acetoxima:



25 cambiando por tanto el equilibrio hidroxilamonio-hidroxilamina:



30 El cambio de pH puede observarse con un indicador ácido-base, p. ej. naranja de metilo. El indicador desprotonado es amarillo y la forma ácida rosa, absorbiendo luz de 520 nm.

35 Marstorp describe una instalación experimental que incluye un analizador por inyección en flujo, que usa una válvula de inyección del tipo de una válvula rotatoria con un solo canal de tamaño variable de la muestra y un baño de agua termostatzado en el que está colocado un sistema modular de bloques, con serpentines tubulares y conectores. El módulo de difusión del gas consiste en dos partes, cada una de la cuales tiene una cavidad de 2 mm de ancho, 80 mm de longitud y 0,2 mm de profundidad. Están separadas entre sí por una membrana de Teflón de 0,07 mm de espesor. La corriente portadora de la muestra se bombea a través de una primera cavidad y la corriente reactiva a través de la otra. Se utilizan una bomba peristáltica con ocho canales y un colorímetro o un fotómetro de paso de flujo con un filtro de 520 nm. Para la recuperación y evaluación de los datos se usa un ordenador. Todos los tubos son de PTFE con un diámetro interno de 0,5 mm. Después de la celda de difusión se incluye un serpentín de 30 cm para dar tiempo suficiente a la reacción entre la acetona y el reactivo. El tamaño de la muestra es de 100 μl . Con un caudal unitario de 1,3 ml por minuto se obtiene un tiempo de propagación de 2,7 segundos como tiempo aproximado de reacción de la acetona y el cloruro hidroxilamónico. Se estima que dicho método ofrece la posibilidad de medir hasta 100 muestras por hora, aproximadamente. La experiencia ha indicado que la válvula de inyección podrá tratar unas 50.000 muestras. Después resultará inservible dicha válvula y será necesario sustituirla.

45 La finalidad de la presente invención es proporcionar un método como el mencionado en el preámbulo y un aparato de medida de un componente, y específicamente un instrumento capaz de medir acetona, que pueda tratar más muestras que los aparatos conocidos hasta ahora, preferentemente unas 250-500 muestras por hora, y un aparato que esté adaptado para operar al menos ocho horas cada día de trabajo, trabajando con un grado elevado de fiabilidad y un remanente bajo, y que sea fácil de limpiar.

50 Esto se consigue con un método y un aparato de la clase mencionada en el preámbulo, que se caracterizan por los rasgos mencionados en la parte caracterizadora de las reivindicaciones 1 y 18.

60 Las válvulas de abrazadera sobre la manguera controladas por temporizador son fáciles de limpiar, fáciles de controlar, muy duraderas y muy fiables. La sobrepresión, es decir la presión de los fluidos portadores, proporciona un caudal unitario deseado lo suficientemente elevado para que una muestra pueda atravesar todo el aparato durante un corto periodo de p. ej. 14,4 segundos, correspondiente a 250 muestras por hora, incluyendo una permanencia de 9,4 segundos en la celda de difusión para asegurar que gran parte del componente a determinar se difundirá a través de la membrana y usándose además la larga permanencia para la reacción entre el reactivo y el componente buscado, a fin de conseguir una detección fiable en la celda de medición de aguas abajo.

65 Con relación a esto, es importante que el caudal unitario aplicado sea elevado (unos 150-160 μl por segundo en mangueras de 1 mm de diámetro) comparado con el caudal unitario de 20 μl por segundo usado normalmente en el FIA (*Flow Injection Analysis* - Análisis por Inyección en Flujo).

ES 2 283 062 T3

En primer lugar, el elevado caudal unitario contribuye a reducir el tiempo total de paso del flujo de una muestra por el aparato, en segundo lugar, el elevado caudal unitario permite que el movimiento del fluido de muestra continúe durante algún tiempo dentro de la “cámara” o del “canal” de la celda de difusión, después de que haya sido detenido el flujo cerrando una válvula controlada de abrazadera sobre la manguera.

5 El movimiento continuado del fluido de muestra en el lado donador mejora la difusión desde el lado donador hacia el lado aceptor del componente examinado (p. ej. acetona). De modo similar, en el lado aceptor también se presenta un movimiento continuado del fluido portador, siendo importante dicho movimiento para la velocidad de difusión, así como para la velocidad de la reacción entre el componente de difusión y el reactivo del fluido portador del lado
10 aceptor. De este modo pueden evitarse los “reactores” o “espirales mezcladoras” usados normalmente en el FIA, que inevitablemente ocasionan dispersión y por tanto un deterioro de la sensibilidad del aparato.

Con la descripción siguiente resultarán evidentes otras ventajas de la invención.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra esquemáticamente un sistema para llevar a cabo la invención.

20 La Figura 2A muestra un ejemplo de una realización de una celda de medición con la forma de una cubeta de flujo de un fotómetro para la detección del contenido de acetona.

La Figura 2B muestra otro ejemplo de una realización de una celda de medición con la forma de una cubeta de flujo de un fotómetro para la detección del contenido de acetona.

25 La Figura 3A muestra un diagrama de un sistema en flujo de una realización preferida de un aparato según la invención, que es capaz de tratar 250 muestras por hora.

La Figura 3B muestra un diagrama de un sistema en flujo alternativo de una realización de un aparato según la invención, que es capaz de tratar 250 muestras por hora.

30 La Figura 4 muestra un diagrama de un sistema en flujo de otra realización preferida de un aparato según la invención, que es capaz de tratar 500 muestras por hora.

35 La Figura 5 muestra como ejemplo un diagrama de la función respecto al tiempo de un aparato de medición de acetona, según la invención y según se muestra en las Figuras 3A, 3B y 4.

La Figura 6 muestra esquemáticamente un ejemplo de un plan cronológico de apertura y cierre de las válvulas correspondiente al diagrama de la Figura 5.

40 La Figura 7 muestra como ejemplo una vista oblicua de una celda de difusión.

La Figura 8 muestra la media parte inferior de la celda de difusión de la Figura 7.

45 La Figura 9 es una vista en sección de la media parte inferior de la celda de la Figura 8 según la línea IX-IX, y

la Figura 10 es una vista en sección de la media parte inferior de la Figura 8 según la línea X-X.

La Figura 11 muestra un diagrama de un sistema en flujo de otra realización de un aparato según la invención, que es capaz de tratar 500 muestras por hora.

50 Descripción detallada de la invención

En lo que sigue se explicará más ampliamente la invención mediante ejemplos del aparato analizador. La Figura 1 muestra esquemáticamente y como ejemplo una disposición de un sistema de un aparato analizador según la invención.
55 Una muestra es aspirada en un sistema en flujo, p. ej. estando dispuesto como se muestra en la Figura 3A, 3B ó 4. El sistema en flujo incluye unos líquidos portadores y una celda de difusión y funciona según el principio de FIA. El componente examinado se separa en la celda de difusión. El componente examinado es arrastrado en el lado aceptor de la celda de difusión por un nuevo líquido portador, que también sirve de reactivo e indicador o que incluye un reactivo y un indicador, que permiten medir y registrar mediante una celda de medición 30 la presencia y preferentemente la
60 cantidad del componente examinado. Un ordenador o módulo similar de control proporciona el almacenamiento y proceso de los datos de la medición, los cuales pueden almacenarse, visualizarse e imprimirse de cualquier manera conocida que se desee. De manera conocida *per se*, el mismo ordenador - o un segundo módulo similar de control - puede estar preparado para ejecutar la temporización de las válvulas y de la bomba peristáltica, de modo que las
65 válvulas se abran y se cierren p. ej. como se indica en la Figura 6. Puesto que la implementación de un control de este tipo es muy conocida no se explicará con mayor detalle.

Los aparatos descritos en lo que sigue están preparados para analizar leche respecto a un posible contenido de acetona. Las Figuras 3A, 3B y 4 muestran esquemáticamente y como ejemplos tres disposiciones casi idénticas de

ES 2 283 062 T3

sistemas en flujo de un aparato analizador para medir acetona en leche. Todas las partes correspondientes tienen las mismas referencias numéricas y la siguiente explicación remite a los tres ejemplos. La Figura 3B difiere de la Figura 3A en que muestra una disposición alternativa de una línea de medición 24. La Figura 4 muestra un sistema en flujo que comprende una celda doble de difusión 20. La disposición de la Figura 3B también puede combinarse con una celda doble de difusión 20, de modo similar al sistema en flujo mostrado en la Figura 4.

10 10 es un recipiente de muestras de leche. 20 es una celda de difusión con una membrana M. 30 es una celda de medición, y preferentemente una celda fotométrica de medición como se muestra en las Figuras 2A ó 2B, en la que el líquido que pasa por la celda es iluminado con luz de 520 nm de longitud de onda. Un detector 76 proporciona una señal eléctrica que indica la absorbancia de la luz. Después de una calibración del aparato puede deducirse el contenido de acetona a partir de dicha señal eléctrica.

15 Los recipientes 12 y 14 se muestran como recipientes cerrados de almacenamiento de un líquido portador o un líquido tampón, preferentemente un tampón citrato, y un reactivo p. ej. cloruro hidroxilamónico + un líquido indicador, estando ambos comprimidos a $0,25 \times 10^5$ Pa (0,25 bar) sobre la presión atmosférica mediante una bomba de aire comprimido P (60) controlada con un manómetro 16 y un regulador de presión 18. En una realización alternativa uno o ambos recipientes de almacenamiento pueden estar abiertos a la atmósfera y provistos de una bomba que permita generar una sobrepresión en un pequeño recipiente a presión conectado a un conducto del líquido portador y que pueda proporcionar de este modo un caudal unitario deseado en el conducto del líquido portador. Preferentemente se usa un caudal unitario de unos 150-160 μ l por segundo. En una realización preferida actualmente, mostrada en la Figura 11, unas bombas de jeringa 101, 102, conectadas entre al menos dos válvulas de abrazadera sobre la manguera W101 y V4/V8/V7 y W102 y V6/V10/V11a respectivamente, proporcionan las presiones y los caudales unitarios deseados. Además, en la Figura 11 está provista una segunda toma de muestras (copa 110, pipeta 122 y válvula V33) p. ej. de aspiración de muestras estándares para ajustar y/o calibrar el aparato.

25 Una cámara 70 recibe leche procedente de la celda de difusión 20 y reactivos procedentes de la celda de medición 30. Además, la cámara 70 recibe líquidos de lavado a través de un conducto 28, llamado "manguera de lavado a", y estos líquidos son dispensados desde la misma como aguas residuales a través de un conducto 66, también llamado manguera de residuos, y de una bomba de acción sobre la manguera (bomba peristáltica) 80. En esta descripción, los medios de conductos son un tubo fino o una manguera flexible, con un diámetro interno típico de 1,0 mm aproximadamente. Preferentemente, los líquidos de lavado son los mismos que los líquidos portadores.

35 En los diagramas mostrados en las Figuras 3-4, V1-V13 son válvulas, y en la realización preferida todas las válvulas son válvulas de abrazadera sobre la manguera, es decir, una válvula que comprende una parte de manguera que puede comprimirse, es decir aplastarse, y cerrarse usando una abrazadera, estando hecha dicha parte de manguera de un material elástico deformable (p. ej. goma o plástico tal como silicona) y que tiene gran capacidad de recuperar rápidamente su forma original cuando cesa la presión de la abrazadera. Esto está en contradicción con el FIA convencional que normalmente usa válvulas rotatorias para conseguir la dosificación/dosis exacta de las muestras.

40 V1 es una válvula de entrada a un conducto 42, denominado "manguera donadora 1", del lado donador de la celda de difusión 20. V2 está situada en la "manguera de bombeo" o rama 34 del lado de succión de la bomba de acción sobre la manguera 80. V3 está situada en el tubo de entrada 32, también llamado manguera de pipeta, que desemboca en una pipeta 22 que puede bajarse hasta el recipiente de muestras 10. V4 está situada en un conducto 36, también denominado "conducto de líquido portador", que lleva el líquido portador del recipiente 12. V5 está situada en la "manguera de lavado a", 28. Los restos de leche y el líquido de lavado se retiran/transfieren a través de la "manguera de lavado a" hacia la cámara de residuos 70. V6 es una válvula de entrada al lado aceptor de la celda de difusión 20, es decir a la manguera aceptor 46 situada en el extremo del segundo conducto de líquido portador 38. V7 es una válvula de entrada del líquido de lavado al conducto 56, también denominado "manguera de lavado b", situado en el lado donador de la celda de difusión 20. (En la realización preferida y mostrada el líquido de lavado es el mismo que el líquido portador y también sirve de líquido tampón). V11 es una válvula del conducto 66, también denominado manguera de residuos, que constituye la salida de la cámara 70. V12 es una válvula de impulsión de la cámara y V13 es una válvula del conducto 68, y la válvula 13 normalmente está abierta a la atmósfera.

55 En la Figura 4 se usa una celda doble de difusión 20 y se introducen tres válvulas extra V8, V9 y V10. La celda de difusión puede ser una cubeta especial de difusión con dos canales 88 a cada lado de la membrana M, preferentemente como se muestra en las Figuras 7-10, o dos celdas separadas. V8 es una válvula de entrada del líquido de lavado en el conducto 58, también denominado "manguera de lavado c", situado en el lado donador de la celda de difusión 20. La válvula V8 se usa para lavar el lado donador de la membrana, del mismo modo que la válvula V7. V9 es una válvula de entrada a un conducto 44, también denominado "manguera donadora 2", situado en el lado donador de la celda de difusión 20. La válvula V9 deja la muestra en el segundo canal 88 de la celda de difusión, del mismo modo que la válvula V1 deja una muestra en el primer canal 88. V10 es una válvula de entrada del lado aceptor de la celda de difusión 20, es decir de la manguera aceptor 48 situada en el extremo del segundo conducto de líquido portador 38. La válvula 10 deja que pase reactivo al segundo canal 88 del lado aceptor de la membrana, del mismo modo que la válvula V6 al primer canal 88.

65 La bomba de acción sobre la manguera 80 puede aspirar líquido del recipiente de muestras 10 a través de la pipeta 22, la válvula V3, la manguera de pipeta 32, la manguera de bombeo 34, una línea de medición 24 - que contiene un volumen de unos 30 μ l - y la válvula V2. La salida de la bomba de acción sobre la manguera está conectada a

ES 2 283 062 T3

la salida A. El conducto 26, también denominado “manguera de mezclado”, está provisto de varios nudos (*knots*) de mezclado 50 que permiten mezclar la muestra de leche y el tampón citrato (usado como líquido portador) antes de introducir la muestra en la celda de difusión 20. El diseño de los nudos 50 supone un compromiso entre la sensibilidad y el mezclado con el tampón. Los nudos mejoran el mezclado, pero prolongan el tubo, de modo que empeora la sensibilidad. Muchos nudos pequeños proporcionan buen mezclado, pero también ocasionan dispersión y pérdida de sensibilidad. La realización actualmente preferida incluye un solo nudo doble (“nudo de pescador”) realizado en una manguera que tiene un diámetro interno de 1 mm.

La manguera mezcladora 26 conecta la línea de medida 24 al lado aceptor de la celda de difusión 20 mediante una conexión en T 40 y a través de la manguera donadora 1 (42), que tiene la válvula V1, y en la Figura 4 a través de la manguera donadora 2 (44) que tiene la válvula V9. La muestra de leche se introduce por la manguera mezcladora 26 en el lado donador de la celda de difusión. El lado aceptor está en comunicación de fluido con la celda de medición 30, p. ej. una cubeta fotométrica, por un conducto 54.

Como puede verse en las Figuras 5-6, el tiempo preferido de transferencia de la muestra de leche de 30 μl a través de los nudos mezcladores 50 hasta la membrana M es de 1 segundo aproximadamente. Esto proporciona la máxima sensibilidad bajo las condiciones presentes. El tiempo óptimo de transferencia de la muestra, es decir, el periodo de tiempo en el que están abiertas las válvulas V4 y V1, depende de la longitud de la manguera que incluye los nudos y la válvula V1 y del volumen de los canales 88 de la celda de difusión. El tiempo de transferencia de la muestra de leche puede encontrarse fácilmente por experimentación variando el tiempo hasta que se obtenga un máximo del impulso de señal.

Se aplica una presión de $0,25 \times 10^5$ Pa (0,25 bares) que proporciona un caudal unitario de 150-160 μl por segundo en los tubos utilizados, que típicamente son mangueras con diámetro interior de unos 0,5 a 2 mm, y preferentemente 1,0 mm.

El descenso de la pipeta, la operación de la bomba de acción sobre la manguera 80, y la apertura y el cierre de todas las válvulas del sistema en flujo, están controlados por temporizador, siendo controlados con un módulo de control o una pluralidad de módulos de control con varios temporizadores, p. ej. controlados mediante un ordenador, tal como un ordenador personal. Además, el ordenador puede proporcionar el almacenamiento y proceso de los datos de medición procedentes del detector fotométrico.

Operación

El diagrama de la Figura 5 muestra esquemáticamente el funcionamiento del sistema en flujo. La mitad superior muestra las funciones de un aparato con una sola celda de difusión, “celda 1”. En la mitad inferior de la Figura 5 se muestran las funciones correspondientes de una posible segunda celda, “celda 2”. La Figura 6 muestra esquemáticamente cuándo se baja la pipeta, cuándo se acciona la bomba de acción sobre la manguera 80 y cuándo se abren y cierran las válvulas V1-V13 en una realización preferida, descrita en lo que sigue.

Se baja la pipeta PIP hasta la copa de muestras 10. Se abren V3 y V2 durante tres segundos mientras se acciona la bomba de acción sobre la manguera 80. Con ello se aspiran unos 3 ml de la muestra de leche en el sistema en flujo - a través de la pipeta 22, la válvula V3, la manguera de pipeta 32 y la línea de medida 24, que tiene un volumen de 30 μl . La dimensión de la línea de medida 24 determina el volumen de la muestra (unos 30 μl) que se enviará a la celda de difusión 20. Realmente el volumen no es crítico, pero debe ser substancialmente el mismo de una muestra a otra. Además - después del mezclado con el líquido portador/líquido tampón procedente del recipiente 12 - debe ser suficientemente grande para que cubra la membrana de la celda de difusión 20. La mayor parte de los 3 ml se usa para purgar los restos de la muestra anterior de leche, que quedaron en la pipeta 22 y en la manguera de pipeta 32, a través de la manguera de bombeo 34 y la bomba de acción sobre la manguera 80.

Simultáneamente se abren las válvulas V7 y V6 durante unos dos segundos, de modo que el lado donador y el lado aceptor de la celda de difusión 20 se lavan con tampón citrato procedente del recipiente 12 a través del conducto de líquido portador 36, la “manguera de lavado b” (56) y la manguera donadora de salida 52, - y con reactivo procedente del recipiente 14 a través del conducto de líquido portador 38, la manguera aceptor 1 (46) (y en la Figura 4 la manguera aceptor 2 (48)), la manguera aceptor de salida 54 y la manguera de salida 55 hacia la cámara 70, respectivamente, para retirar los restos de la muestra previa. Ambos lados de la membrana se lavan con el mismo caudal unitario y la misma presión para evitar la deformación y por tanto el desgaste mecánico de la fina membrana. Después se cierran las válvulas V6 y V7.

Ahora se abren V4 y V1 durante un segundo, con lo que el tampón citrato procedente del recipiente 12 es impulsado por el conducto de líquido portador 36 que comprende la válvula V4 de modo que la muestra de leche de 30 μl de la línea de medida 24 es impulsada a través de los nudos mezcladores 50 y la “manguera donadora 1” (42) que comprende la válvula V1 y entra en el lado donador de la celda de difusión 20. La válvula V6 del lado aceptor se mantiene abierta durante el mismo periodo de tiempo, con lo que el reactivo procedente del recipiente 14 es impulsado por el conducto de líquido portador 38 (y en la Figura 4 por la manguera aceptor 46) que comprende la válvula V6 y luego a través del conducto 54 hacia la celda de medición 30, de modo que ambos lados de la membrana M quedarán expuestos de nuevo al mismo caudal unitario.

ES 2 283 062 T3

Preferentemente, la bomba de acción sobre la manguera 80 funciona durante un corto periodo de p. ej. 100 ms poco después de la introducción de la muestra en la celda de difusión - y al mismo tiempo que V3 y V2 permanecen abiertas. La pipeta 22 usada para aspirar la muestra de la copa de muestras 10 está levantada encima de la copa en esta etapa. Por consiguiente, una apertura breve de las válvulas V3 y V2 provoca la succión de una pequeña cantidad de
5 aire en la pipeta (inhalación de la pipeta). Esto proporciona buena separación entre las muestras de leche, disminuyendo de este modo el remanente en la línea de leche. Tras la introducción de la muestra de leche en la celda de difusión 20 se cierran la válvula V1 (de la manguera donadora 1, (42)) y la válvula V6 (de la manguera aceptora 46 situada en el extremo del conducto de líquido portador 38), de manera que los líquidos se mantienen en ambos lados de la membrana M durante un periodo predeterminado de tiempo mientras se difunde la acetona a través de la membrana
10 M. Este periodo debería ser de unos 5-20 segundos y preferentemente de unos 10 segundos. En la Figura 6 se muestra de 9,4 segundos. En las Figuras 5 y 6 se muestra la "inhalación" inmediatamente después de que la muestra ha entrado en la celda de difusión. No obstante, la "inhalación" puede disponerse en cualquier momento del periodo en el que la pipeta tiene una posición levantada.

15 En el período de difusión - durante el que la muestra se mantiene en la celda de difusión 20 - el tiempo puede usarse para lavar la línea de medida 24 de 30 μ l y la manguera mezcladora 26 que comprende los nudos mezcladores 50, estando abiertas durante dos segundos la válvula V4 del conducto de líquido portador 36 y la válvula V5 de la "manguera de lavado a" (28), de modo que el tampón citrato sea impulsado hacia arriba por la bomba de aire comprimido 60 a través del conducto de líquido portador 36, de la línea de medida 24 y de la manguera mezcladora
20 26 con nudos mezcladores 50 hasta una conexión 40 y luego salga por la manguera de lavado a (28) hacia la cámara de residuos 70. Entonces se cierran de nuevo las válvulas V4 y V5.

Tras el período de difusión se abren las válvulas V4, V1 y V6 durante 1 segundo, cerrándolas de nuevo después. Con esta operación es impulsado hacia arriba el tampón citrato a través del conducto de líquido portador 36, de la línea
25 de medida 24, de la manguera mezcladora 26, de la conexión 40, de la "manguera donadora 1" (42), que comprende la válvula V1, del lado donador de la celda de difusión 20 y sale por la manguera donadora de salida 52 hacia la cámara de residuos 70. De este modo se lavan con líquido tampón los restos de leche de la válvula V1 y del lado donador de la membrana. Al mismo tiempo la bomba de aire comprimido 60 impulsa hacia arriba el líquido reactivo a través del conducto de líquido portador 38 (y de la manguera aceptora 46 en la Figura 4) que tiene la válvula V6 y luego por
30 el lado aceptor de la celda de difusión, haciendo de este modo que la parte de líquido reactivo que ha quedado en la celda de difusión durante el período de difusión, y que ha absorbido la acetona difundida, sea impulsada hacia la celda de medida 30, p. ej. un fotómetro, en la que puede detectarse como impulso de tensión el cambio de color del líquido reactivo debido a la acetona, p. ej. registrarse mediante un ordenador, y opcionalmente visualizarse en un osciloscopio (o en la pantalla del ordenador empleado).

35 Se repite el mismo procedimiento con la muestra siguiente de leche y sucesivas. En el diagrama funcional de la Figura 5-6 puede verse que un ciclo completo de medición tarda 14,4 segundos. Después se aspira en el sistema una nueva muestra. Los 14,4 segundos por muestra corresponden a 250 muestras por hora.

40 Ha de entenderse que el tiempo se usa óptimamente para purgar el sistema con objeto de conseguir el elevado número de 250 muestras por hora:

1) Ya durante el período de difusión, cuando los líquidos permanecen en la celda de difusión, se lavan la línea de medida de 30 μ l y los nudos mezcladores.
45

2) Inmediatamente después del período de difusión y durante el paso del líquido aceptor por la celda de medición, se empieza el lavado de la celda de difusión abriendo las válvulas V1, V4, V6/V9, V4, V10 (medida + lavado).

3) Durante la aspiración de la muestra en el sistema en flujo se lavan ambos lados de la membrana durante unos 2-
50 3 segundos (V7, V6).

4) El plan cronológico de apertura y cierre de las válvulas asegura que se mantenga la misma presión en ambos lados de la membrana para evitar la deformación y por tanto el desgaste de la membrana.

55 La acetona es una molécula grande. Por consiguiente su difusión a través de la membrana es un proceso lento. Además, la reacción entre la acetona y el reactivo aplicado, cloruro hidroxilamónico, tarda un tiempo considerable. En la técnica anterior se insertaba un serpentín mezclador entre el lado aceptor de la celda de difusión y la cubeta fotométrica para asegurar un mezclado y una reacción completos.

60 Según la presente invención el tiempo de reacción está incluido en el tiempo total de permanencia de los líquidos en la celda de difusión. Se soslaya cualquier longitud extra (innecesaria) de manguera, tal como un serpentín mezclador, que pudiera producir dispersión y por tanto pérdida de sensibilidad.

La función del aparato que tiene la celda doble de difusión, en principio es como se describe para la celda simple, pero las funciones de las dos celdas se desplazan entre sí de manera ventajosa a fin de que el sistema en flujo se aplique
65 óptimamente. Como se muestra en los cronogramas de las Figuras 5 y 6, la aspiración en la celda 2 comienza en la mitad del ciclo de medición de muestras de la celda 1, es decir, 7,2 segundos después del comienzo de la aspiración en el sistema en flujo que entra en la celda 1.

ES 2 283 062 T3

Con la disposición de la Figura 4 puede tomarse una nueva muestra cada 7,2 segundos, es decir, 500 muestras por hora, manteniendo un tiempo de difusión de 9,4 segundos. El uso de un tiempo de difusión más corto da lugar a menor sensibilidad.

5 Preferentemente, la celda doble de difusión puede diseñarse como se muestra en la Figura 7, que muestra una celda ensamblada 20, y en las Figuras 8-10 que muestran una media parte 82 de la celda. Preferentemente, las dos mitades tienen substancialmente la misma forma, p. ej. mantenidas juntas entre sí con abrazaderas (no mostradas) y dos orificios pasantes 84, 86 con tornillos o pernos (no mostrados). El posicionamiento exacto de las dos mitades puede asegurarse con dos trozos cortos de tubo 87 dispuestos en cada orificio taladrado 86. Preferentemente, una de
10 las mitades 82 está provista de accesorios de montaje ajustado a los trozos de tubo 87 de los orificios taladrados 86, y la otra mitad 82 está provista de accesorios de montaje holgado en los trozos de tubo 87 de los orificios taladrados 86. De este modo se desmonta y vuelve a montarse fácilmente la celda de difusión para sustituir la membrana M.

Los canales 88 de fluido deberían tener la menor profundidad posible para obtener la mejor sensibilidad posible.
15 Se usa preferentemente una profundidad de 0,3 mm para evitar los problemas debidos a burbujas de aire atrapadas en la celda. La anchura de los canales puede ser de 3 mm. El criterio de elección de las dimensiones, incluyendo la anchura, es obtener una superficie grande de membrana, pero con pequeña deformación en caso de pequeñas diferencias de presión. Si el volumen de fluido se hace demasiado grande resulta más difícil el lavado de la celda de difusión, haciendo que aumente el remanente entre las muestras. La entrada y la salida se disponen mediante tubos
20 finos 90, introducidos en orificios taladrados en cada extremo de y preferentemente perpendiculares a los canales 88 de fluido.

Las Figuras 2A y 2B muestran dos ejemplos de una disposición óptica en la que la celda de medición 30 es una celda fotométrica con un camino óptico 75 dispuesto entre una fuente luminosa 74 y un fotodiodo que sirve de detector
25 76 y va seguido por un amplificador electrónico 77. La fuente luminosa puede ser una lámpara halógena y 73 es un filtro óptico de 520 nm. Preferentemente se usa un LED potente de 520 nm. Tal LED puede montarse directamente en la celda de medición 30 y elimina la necesidad de un filtro óptico.

El fluido aceptor circula por la manguera aceptor de salida 54 y entra en un canal de la celda de medición 30,
30 llenando el camino óptico 75, avanzando por un canal y siguiendo por el conducto 55 hacia la cámara de residuos 70. En la celda el líquido aceptor es iluminado por la luz de 520 nm a lo largo del camino óptico 75. Debido al fluido aceptor utilizado, la presencia de acetona producirá un cambio de color que implica un aumento medible de la absorción de la luz de 520 nm. Preferentemente debería ser corta la longitud del recorrido desde la celda de difusión 20 por la manguera aceptor de salida 54, y el volumen de la celda de medición debería ser lo menor posible para mantener baja la dispersión. (En esta especificación, "Dispersión" significa el mezclado no deseado con el fluido portador, que debilita el cambio de color y disminuye por tanto el impulso electrónico que se registra). Es importante una dispersión baja en relación con la sensibilidad del aparato respecto a la acetona. Además, el camino óptico tendrá una longitud suficiente para permitir la detección del aumento de absorción provocado por el cambio de color del indicador. Preferentemente se usa un camino óptico de 6 mm con un diámetro de 1 mm (p. ej. correspondiente al de los cables ópticos). Como se muestra en la realización de la Figura 2B, la fuente luminosa 74 y/o el camino óptico
40 75 pueden conectarse mediante cables ópticos 78. De este modo puede asegurarse que exista cierta distancia entre la cubeta 30 llena de fluido y el conjunto de circuitos electrónicos relacionados con la detección de los impulsos de las señales que representan la medida de la presencia de acetona. En una realización preferida actualmente la celda de difusión y la celda de medición están dispuestas substancialmente adyacentes entre sí. En una realización aún más
45 ventajosa (no mostrada) las dos celdas pueden integrarse en una sola unidad que combina el canal aceptor 88 con el camino óptico de la celda de medición.

Influencia en la leche del contenido de amoniaco

50 Esta influencia ha sido ignorada en la técnica anterior. Sin embargo, la experiencia del presente inventor indica que el contenido de amoniaco de las muestras de leche puede llegar a ser cinco veces el contenido normal. En tales casos no es aceptable que se ignore el contenido de amoniaco de la leche. El amoniaco se difunde a través de la membrana produciendo un impulso negativo procedente del detector y por tanto un error en la medición de la acetona. A fin de minimizar el error del amoniaco se sugiere mezclar la muestra con un tampón que sea capaz de combinarse con
55 el amoniaco, es decir, un tampón que tenga un valor de pH bajo. En el aparato conocido, como portador en el lado donador se usa un tampón fosfato neutro. Según la presente invención se aplica un tampón ácido y preferentemente un tampón de ácido cítrico con un pH = 6,6 aproximadamente.

Los experimentos con el tampón antes mencionado y nudos mezcladores 50 con muestras que tenían cinco veces
60 el contenido normal de amoniaco en leche, mostraron un error en la medición de acetona de sólo 0,04 mM, lo cual es la décima parte del límite inferior de la cetosis (0,4 mM de acetona) y esto es aceptable. Aumentando la concentración del tampón puede asegurarse una influencia aún menor del amoniaco.

Ventajas obtenidas con el nuevo método y el aparato

65 El nuevo método y el aparato son ventajosos especialmente porque proporcionan una velocidad de muestreo de hasta 500 muestras/h. La aplicación de válvulas de abrazadera sobre la manguera, en lugar de las válvulas rotatorias de inyección usadas convencionalmente en el FIA, es esencial para conseguir la elevada velocidad de muestreo. Las

ES 2 283 062 T3

válvulas de abrazadera sobre la manguera son muy fiables y duraderas. Además, las válvulas de abrazadera sobre la manguera son fáciles de lavar y no tienen volúmenes “muertos” que son difíciles de limpiar minuciosamente.

5 El FIA convencional aplica bombas de acción sobre la manguera y un flujo líquido de 1-1,3 ml por minuto = 16-22 μ l por segundo. En la presente invención se desea mayor caudal unitario, es decir, 150-160 μ l por segundo. Las bombas de acción sobre la manguera - también denominadas bombas peristálticas - en realidad no son adecuadas porque la manguera se desgasta y tiene que sustituirse, requiriendo a menudo una nueva calibración. En consecuencia, en el nuevo sistema en flujo se sustituyen las bombas de acción sobre la manguera, por válvulas de abrazadera sobre la manguera controladas por temporizador. El necesario elevado flujo de fluido se obtiene estableciendo una sobrepresión en los conductos y/o recipientes de los líquidos portadores, p. ej. en los recipientes de almacenamiento. Esto puede efectuarse, por ejemplo, como se muestra en las Figuras 3 y 4 usando una bomba de aire comprimido P y un regulador de presión, ajustados adecuadamente a $0,25 \times 10^5$ Pa (0,25 bares). El flujo líquido de la pluralidad de conductos puede controlarse según se desee usando la combinación: sobrepresión en los recipientes cerrados y válvulas de abrazadera sobre la manguera controladas por temporizador. El elevado caudal unitario se obtiene sin apenas desgaste de las mangueras.

20 La única bomba de acción sobre la manguera presente en el sistema en flujo, según la invención, no es crítica. La bomba tiene que aspirar en el sistema tanta leche como intercambie completamente la línea 24 de leche durante el periodo (p. ej. 3 segundos) de aspiración de las muestras.

25 Según la invención, el tiempo de difusión (la difusión de acetona a través de la membrana M) y el tiempo de reacción (la reacción de la acetona con el líquido aceptor situado en el otro lado de la membrana), se usan junto con una “detención de flujo”, es decir, que los líquidos de ambos lados de la membrana permanecen durante un periodo en la celda de difusión mientras se difunde la acetona a través de la membrana. De este modo se aumenta la sensibilidad, pero al mismo tiempo se aumenta el tiempo de medición por muestra, disminuyendo por tanto el número de muestras medido por hora. Según la invención, esta disminución se compensa aumentando el caudal unitario mediante la utilización de la sobrepresión en los recipientes de almacenamiento 12, 14. Además, según la invención se usa una celda doble de difusión, de modo que se duplica el número de muestras por hora. Además, el mayor caudal unitario puede hacer que el líquido de las cámaras de la celda continúe su movimiento durante parte del período de difusión. Esto mejora la difusión a través de la membrana y la reacción entre la acetona y el reactivo.

35 En el sistema en flujo mostrado en las Figuras 3 y 4 se evitan en lo posible las bombas de acción sobre la manguera - también denominadas bombas peristálticas. Se usa una sola bomba peristáltica 80 para la aspiración de una muestra de leche y para descargar de la cámara 70 los residuos. Para estos fines la bomba peristáltica no es crítica porque no influye en la exactitud de la dosificación de la celda de medición o de la celda de difusión. Además, la bomba peristáltica 80 puede proporcionar la aireación de la celda de medición (cubeta fotométrica) y su limpieza después del uso.

40 El nuevo método y el nuevo aparato según la invención son ventajosos específicamente porque tienen un sistema de lavado minucioso, que asegura una limpieza correcta entre las muestras del sistema en flujo para minimizar el remanente. El sistema de lavado se simplifica porque se usan válvulas de abrazadera sobre la manguera, en vez de válvulas deslizables y bombas peristálticas. La válvula de abrazadera sobre la manguera es fácil de lavar/limpiar y es muy fiable, al contrario que las válvulas deslizables que se aplican generalmente en el FIA y que se desgastan rápidamente. El sistema opera con rapidez gracias a un plan cronológico muy eficaz (Figura 5) y a los elevados caudales unitarios, los cuales se obtienen fundamentalmente estableciendo una sobrepresión en los recipientes de almacenamiento o en los conductos de fluidos portadores que suministran los fluidos de los recipientes de almacenamiento.

50 A las personas de la técnica les resultará obvio que las realizaciones descritas pueden variarse de muchas maneras dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. En los ejemplos descritos se detiene el flujo durante el período de difusión. No obstante, también se tiene en cuenta dejar que el flujo continúe muy lentamente a través del aparato. Ha de ponerse de relieve específicamente que la invención no se limita a la determinación de acetona. Con el método reivindicado pueden determinarse otros componentes químicos usando como líquido tampón y reactivo los fluidos portadores apropiados. Tampoco se limita a líquidos. También pueden usarse gases. Asimismo, algunos de los medios de control de flujo que se muestran como válvulas de abrazaderas sobre la manguera, podrían incorporarse en bombas controladas de acción sobre la manguera.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación del contenido de un componente de una muestra de fluido mediante Análisis por Inyección en Flujo, en cuyo método se aspira una muestra en un sistema en flujo, y una fracción de la muestra se introduce por inyección en flujo en una línea de un primer fluido portador y se hace pasar por el lado donador de una celda de difusión (20) que comprende una membrana (M), de modo que durante un período de difusión el componente se separa por difusión a través de la membrana (M) hacia un lado aceptor de la membrana (M) y durante un período de reacción reacciona con un reactivo de un segundo fluido portador situado en el lado aceptor, y en el que el segundo fluido portador, que incluye el reactivo y el componente difundido, fluye hacia una celda de medición (30) preparada para la determinación del contenido del componente, y en el que los dos lados de la celda de difusión (20) se lavan con los fluidos portadores primero y segundo, respectivamente,

caracterizado porque

- se establece una presión en la comunicación con los conductos (36, 38) de los fluidos portadores que proporciona unos caudales unitarios de los fluidos portadores primero y segundo mayores de $100 \mu\text{l}$ por segundo,

- durante un período predeterminado se detiene o se reduce substancialmente el flujo mientras se llena con fluido de muestra la celda de difusión (20), de modo que en la celda de difusión (20) se produce substancialmente la reacción entre el reactivo y el componente a determinar,

- y el flujo se regula mediante válvulas de abrazadera sobre la manguera controladas por temporizador.

2. Un método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los caudales unitarios son superiores a $100 \mu\text{l}$ por segundo y preferentemente son superiores a $125 \mu\text{l}$ por segundo y más preferentemente son de unos $150\text{-}160 \mu\text{l}$ por segundo durante la inyección de la muestra en el lado donador de la celda de difusión (20), y después, durante la transferencia del segundo fluido portador al interior de la celda de medición (30) en el lado aceptor, dichos caudales unitarios están determinados por las presiones existentes en recipientes cerrados de almacenamiento (12, 14) de los fluidos portadores y/o dichos caudales unitarios están determinados por una presión y un flujo inducidos por una bomba de jeringa (101, 102).

3. Un método según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque durante un período de lavado el caudal unitario es superior a $100 \mu\text{l}$ por segundo y preferentemente es superior a $125 \mu\text{l}$ por segundo y más preferentemente es de unos $150\text{-}160 \mu\text{l}$ por segundo, estando determinado dicho caudal unitario por las presiones existentes en recipientes cerrados de almacenamiento (12, 14) de los fluidos portadores y/o una presión y un flujo inducidos por una bomba de jeringa (101, 102), en el que los recipientes cerrados de almacenamiento (12, 14) y la bomba de jeringa (101, 102) son idénticos a los de la reivindicación 2, si la reivindicación depende de la reivindicación 2.

4. Un método según la reivindicación 1, 2 ó 3, **caracterizado** porque la presión es de unos $0,1 \times 10^5$ a $0,5 \times 10^5$ Pa y preferentemente $0,25 \times 10^5$ Pa.

5. Un método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los fluidos portadores primero y segundo son un tampón y un reactivo, respectivamente.

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la muestra es una muestra de leche.

7. Un método según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el componente a determinar es acetona.

8. Un método según la reivindicación 5 ó según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 como dependientes de la reivindicación 5, **caracterizado** porque el fluido tampón existente en el lado donador es ácido, que tiene un pH menor de 6,8 y preferentemente un pH de 6,6, para que se combine con el amoníaco.

9. Un método según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el contenido de acetona se determina mediante una medición fotométrica, especialmente una medición a 520 nm .

10. Un método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la celda de medición (30) y ambos lados de la celda de difusión (20) se lavan mediante dichos fluidos portadores respectivos al menos durante una parte del período de aspiración durante el que se aspira una nueva muestra en el sistema, preferentemente durante al menos el 60% y más preferentemente durante al menos el 90% del período de aspiración.

11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque tras la aspiración una fracción de la muestra queda situada en una línea de medida (24).

12. Un método según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la fracción situada en la línea de medida (24) es impulsada hacia el lado donador de la celda de difusión (20) a través de conductos y nudos mezcladores (50) abriendo durante un corto período varias válvulas que comprenden una válvula de fluido portador (V4) y válvulas de entrada

ES 2 283 062 T3

a la celda de difusión de ambos fluidos portadores primero y segundo (V1, V6), en el que después el contenido de la muestra de la celda de difusión (20) permanece en ella durante un tiempo predeterminado.

13. Un método según la reivindicación 12, **caracterizado** porque los conductos que incluyen la línea de medida (24) y los nudos mezcladores (50) se lavan tras la introducción de la muestra en la celda de difusión (20) abriendo una pluralidad de válvulas, que comprende la válvula de fluido portador (V4), durante un período predeterminado (LAVADO X) que coincide con al menos parte del período de difusión.

14. Un método según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la muestra, tras el período de difusión, se expulsa de la celda de difusión (20) abriendo de nuevo una pluralidad de válvulas que comprende la válvula de fluido portador (V4) y las válvulas de entrada a la celda de difusión de ambos fluidos portadores primero y segundo (V1, V6), de modo que el conducto (42) que comprende la válvula de entrada a la celda de difusión del primer fluido portador (V1) se lava con el fluido portador puro situado en la línea de medida (24) y en el nudo (50), mientras se expulsa el fluido situado en el lado donador de la celda de difusión (20) y se expulsa el fluido situado en el lado receptor de la celda de difusión (20) a través de la celda de medición (30).

15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se aplica una pluralidad de celdas de difusión (20), o una celda de difusión que tiene una pluralidad de conjuntos de canales (88, celda 1, celda 2), y un suministro alternativo de nuevas muestras a las celdas de difusión (20) o los conjuntos de canales (88, celda 1, celda 2).

16. Un método según cualquier reivindicación precedente, **caracterizado** porque se aplica una celda doble de difusión (20) que tiene dos conjuntos de canales (88, celda 1, celda 2).

17. Un método según la reivindicación 15 ó 16, **caracterizado** porque una de las celdas de difusión (celda 1) y la celda de medición (30) se lavan durante una parte del período de difusión de la otra celda de difusión (celda 2) o de las otras celdas de difusión, mientras en la otra u otras celdas (celda 2) permanece una muestra.

18. Aparato que tiene un sistema en flujo para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes y que comprende al menos una celda de difusión (20) y una celda de medición (30), además de

1) al menos una pipeta de aspiración (22) dispuesta de modo que esté en comunicación de fluido con la celda de difusión (20) a través de conductos,

2) un primer recipiente de almacenamiento (12) para contener un primer fluido portador que también sirve de tampón y de fluido de lavado,

3) un segundo recipiente de almacenamiento (14) para contener un segundo fluido portador que también sirve de reactivo y de fluido de lavado,

caracterizado porque el aparato también comprende medios para establecer una presión en la comunicación con conductos (36, 38) de los fluidos portadores a un nivel tal que se suministran los fluidos portadores del mismo con un caudal unitario superior a 100 μl por segundo,

- porque el sistema en flujo comprende válvulas de abrazadera sobre la manguera controladas por temporizador (V1, V4, V6) para controlar los caudales unitarios de los fluidos portadores primero y segundo, respectivamente,

- y porque las válvulas de abrazadera sobre la manguera (V1, V4, V6) están adaptadas de modo que cuando la muestra ha llegado a la celda de difusión (20) el flujo que atraviesa la celda de difusión (20) se detiene o se reduce substancialmente durante un período predeterminado, preferentemente de 5 a 20 segundos y más preferentemente de unos 10 segundos.

19. Aparato según la reivindicación 18, **caracterizado** porque los recipientes de almacenamiento (12, 14) son recipientes cerrados que pueden estar bajo presión y conectarse a la celda de difusión (20) a través de válvulas controladas de abrazadera sobre la manguera (V4, V1, V6) y/o porque están dispuestas bombas de jeringa (101, 102) y válvulas (W101 y V4/V8/V7 y W102 y V6/V19/V11a) para suministrar fluido *comprimido* desde un depósito a los conductos de líquidos portadores.

20. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, **caracterizado** por la disposición de una cámara de residuos (70) en conexión de fluido con una salida de la celda de difusión (20) y con una salida de la celda de medición (30) y preparada para descargar los fluidos por conductos conectados a una salida de descarga (A).

21. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, **caracterizado** porque la celda de difusión (20) está provista de al menos dos conjuntos de canales (88) que pueden accionarse de modo que el proceso de difusión se desarrolle/tenga lugar en un primer conjunto de canales (celda 1) mientras el otro conjunto u otros conjuntos de canales (celda 2) se lava(n) con uno o más fluidos de lavado.

ES 2 283 062 T3

22. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, **caracterizado** porque dispone de un control de las válvulas para lavar la línea de medida (24), la manguera mezcladora (26) y el nudo mezclador (50) mientras la muestra permanece en la celda de difusión (20).

5 23. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, **caracterizado** porque el control de las válvulas está preparado para lavar la membrana durante la aspiración de la muestra.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

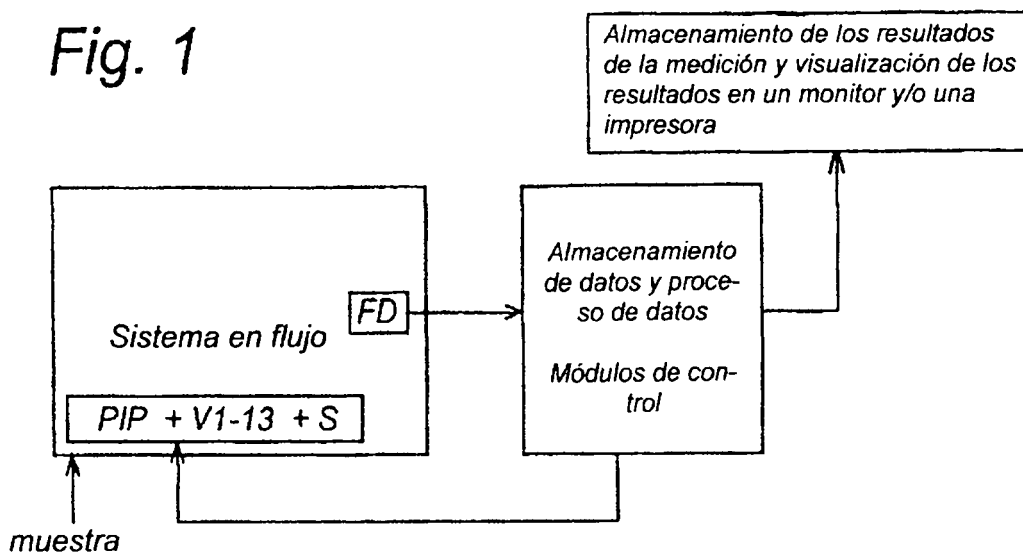


Fig. 2A

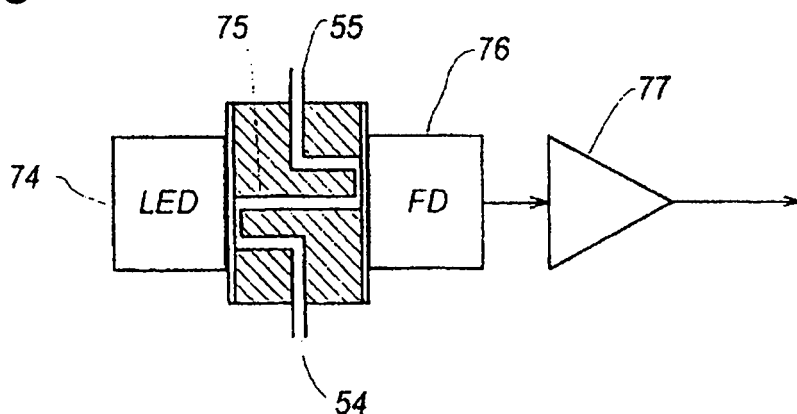
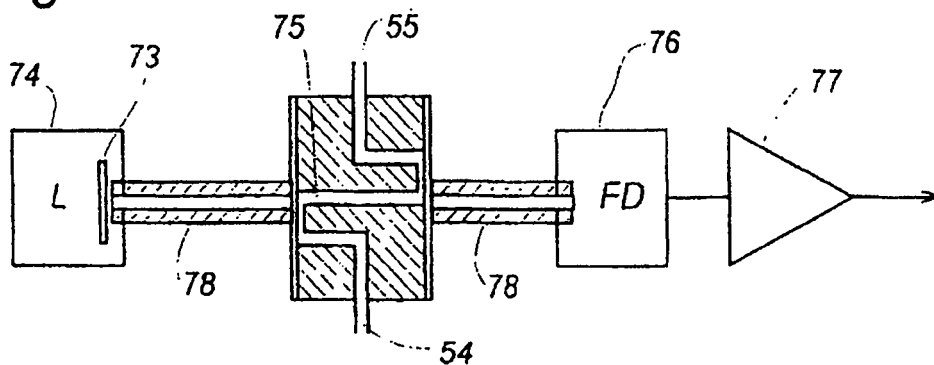


Fig. 2B



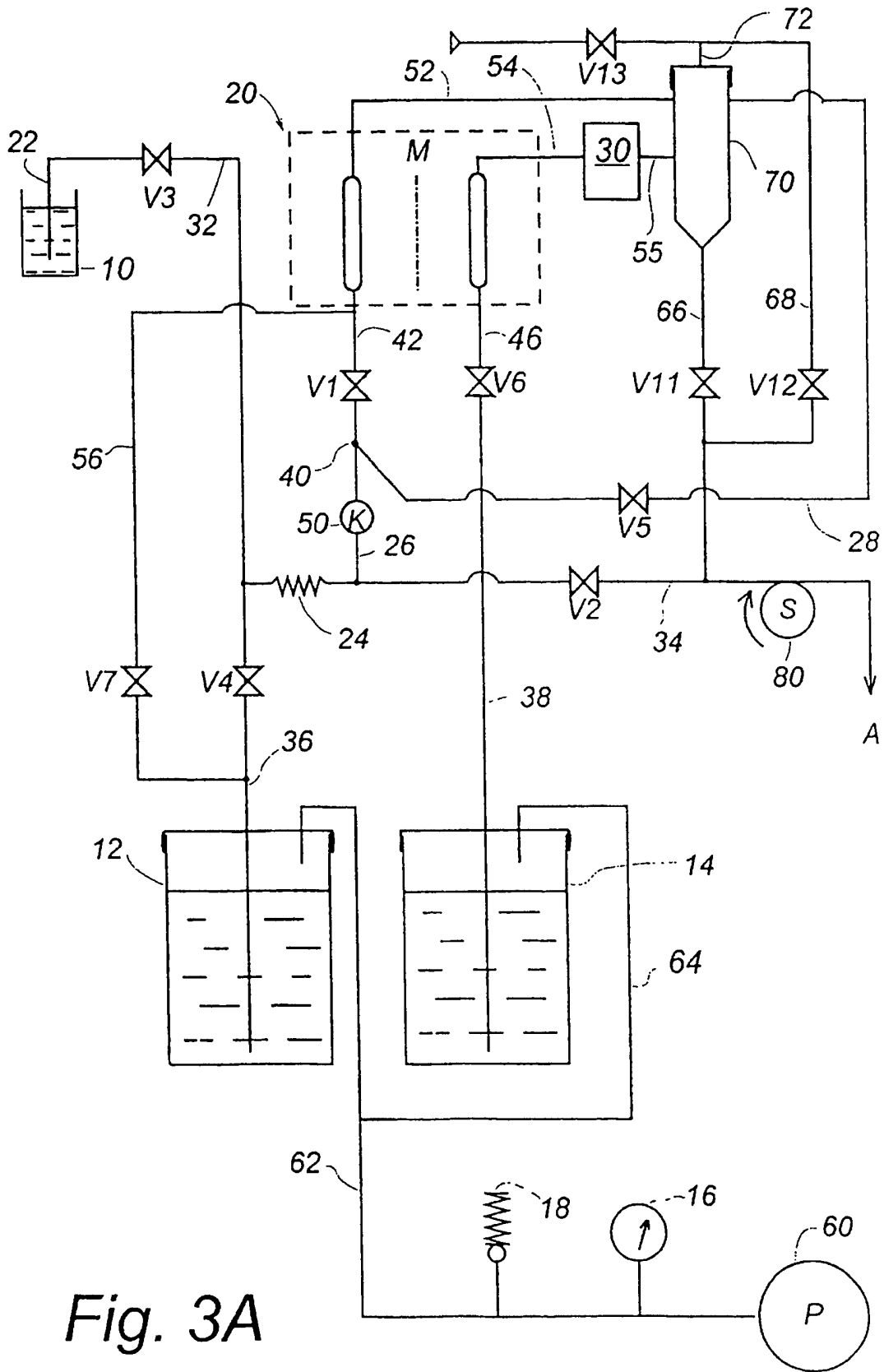


Fig. 3A

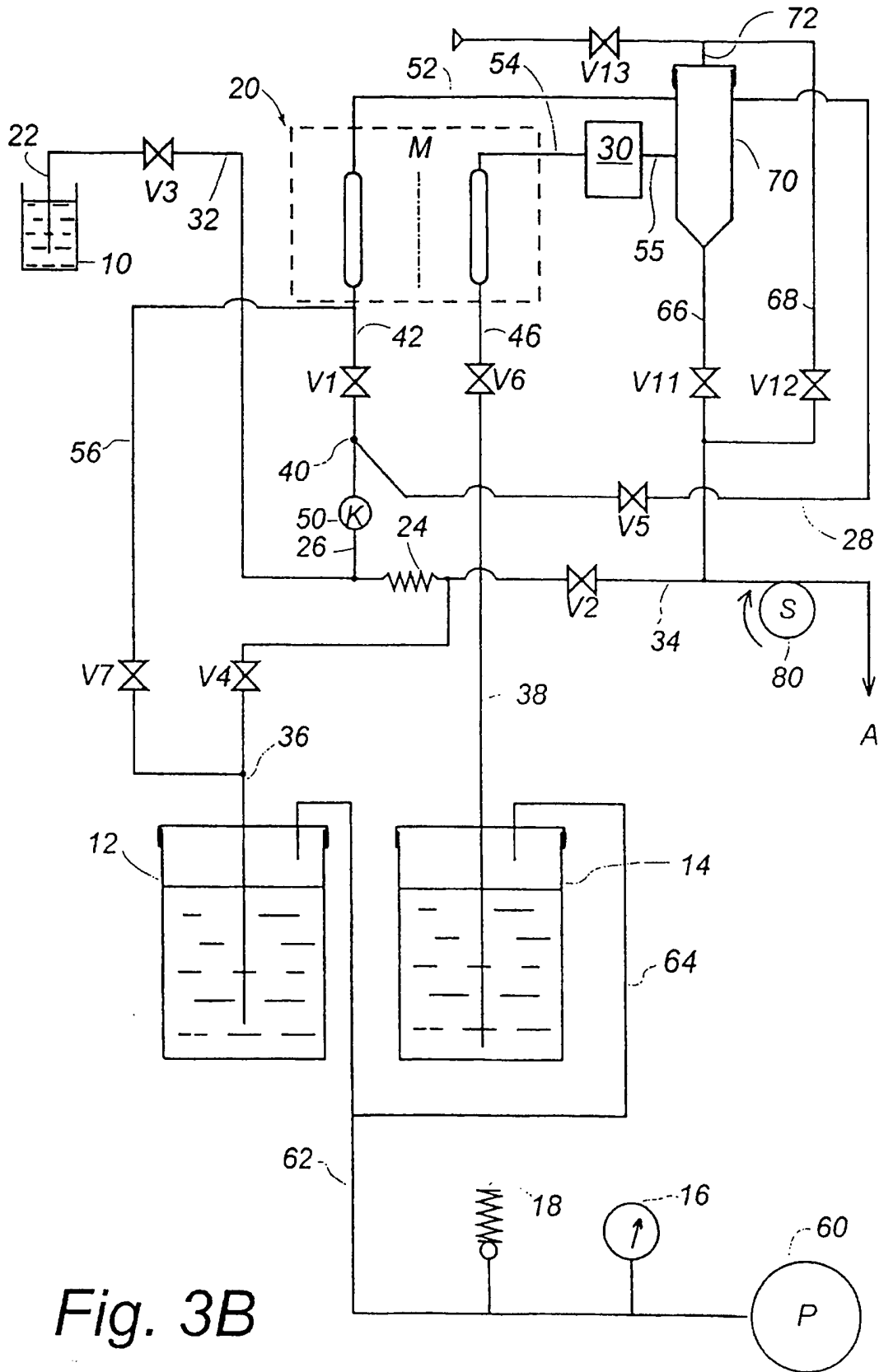


Fig. 3B

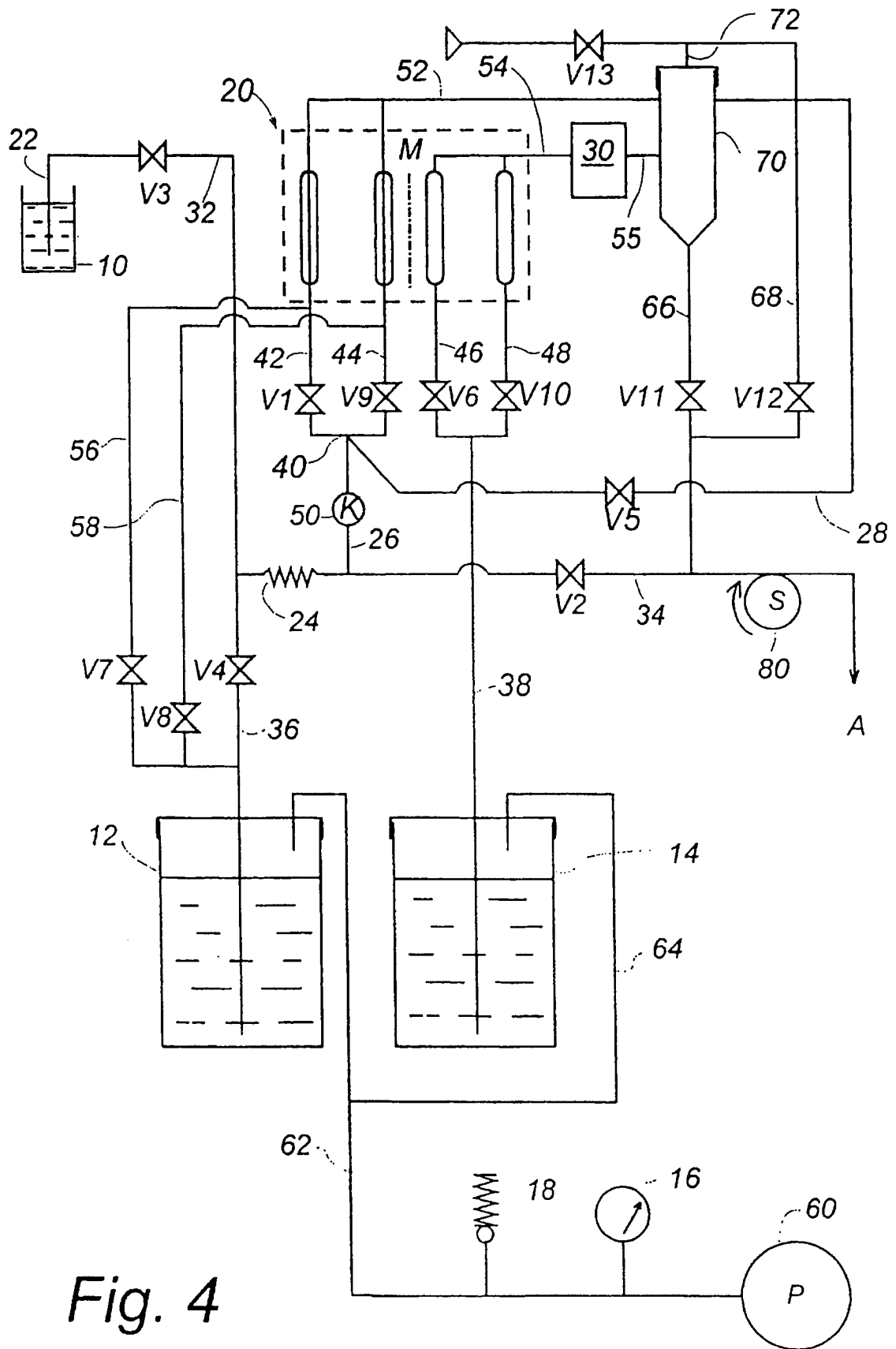


Fig. 4

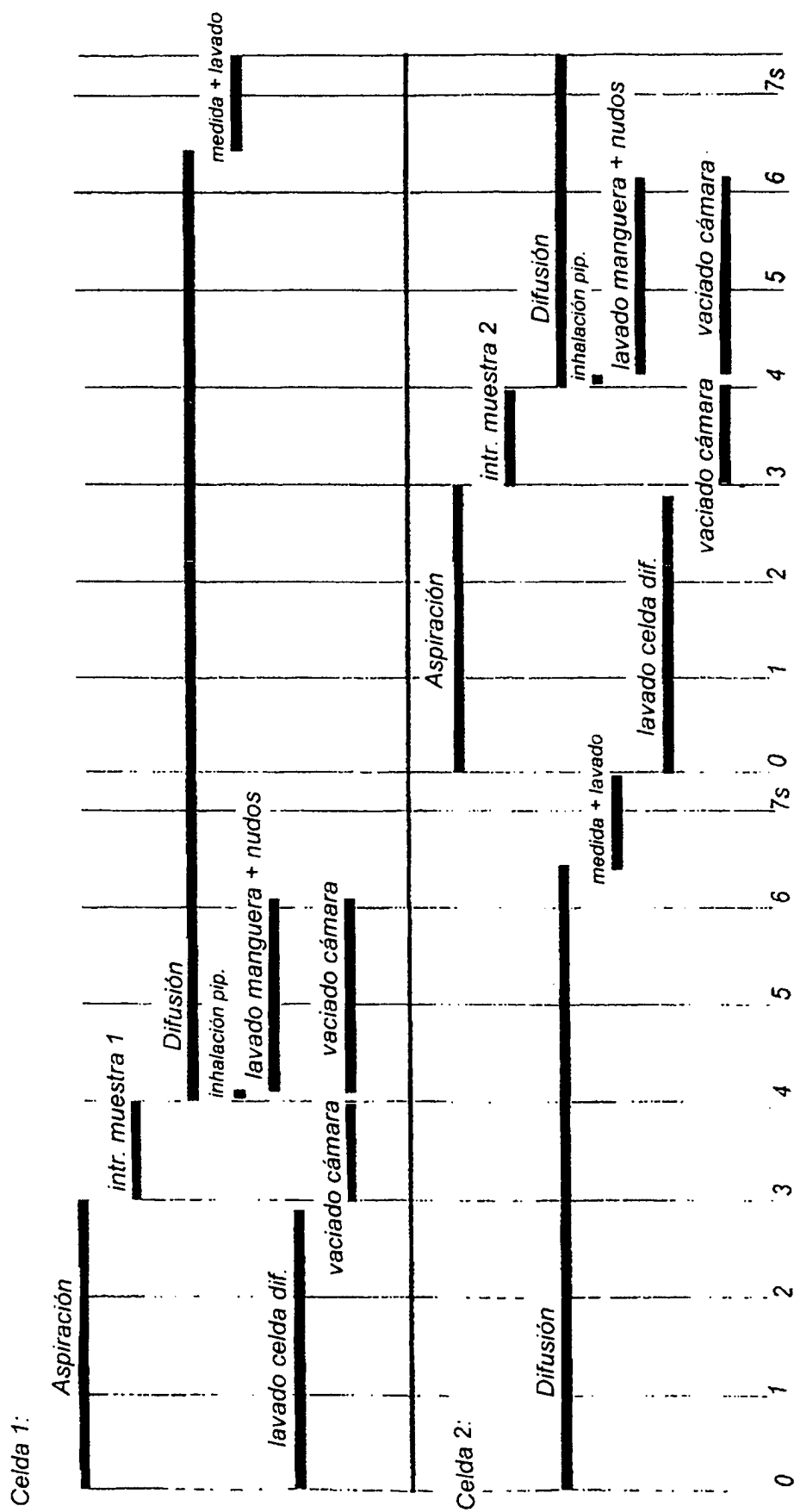


Fig. 5 Cronograma para celda simple y doble

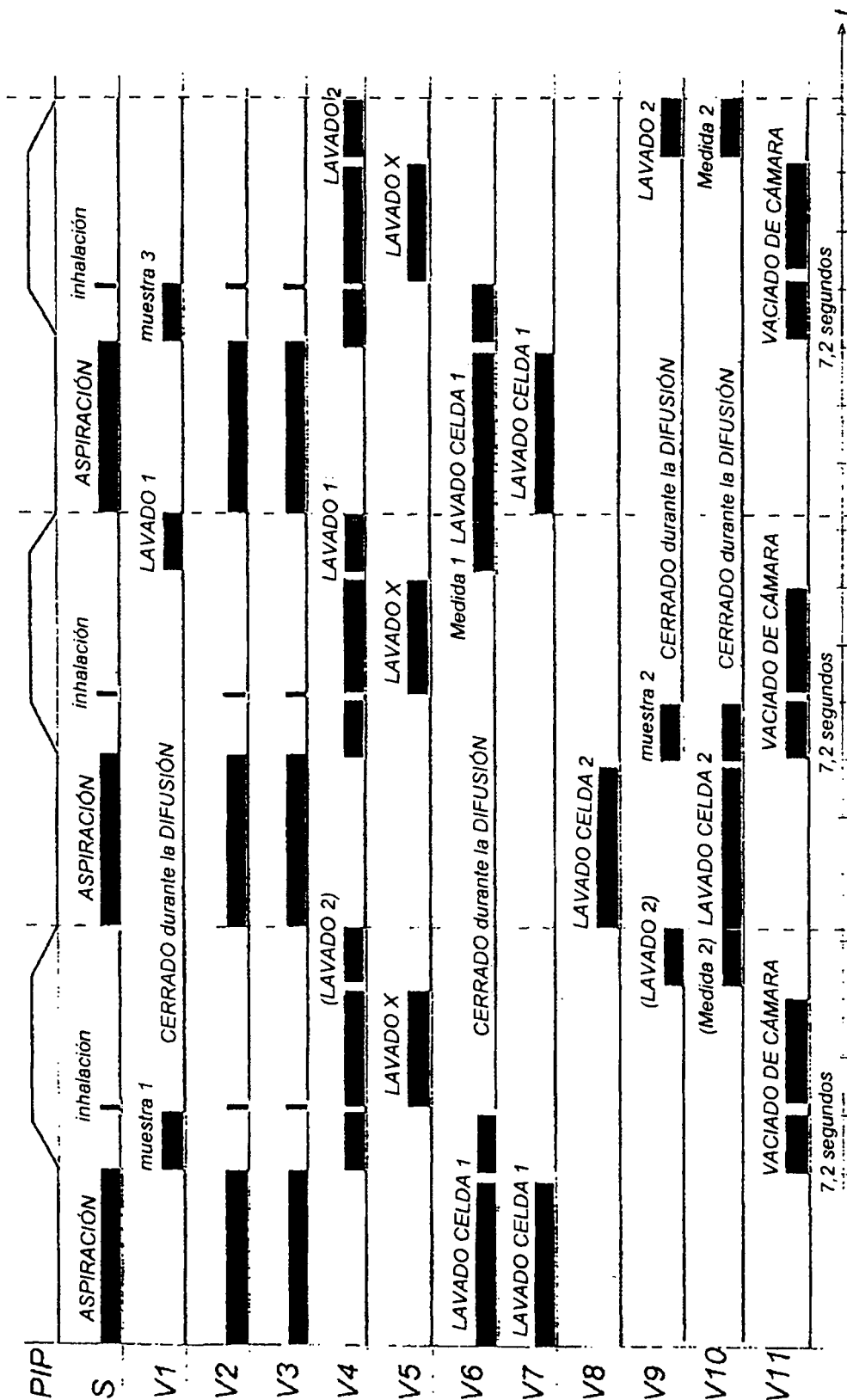
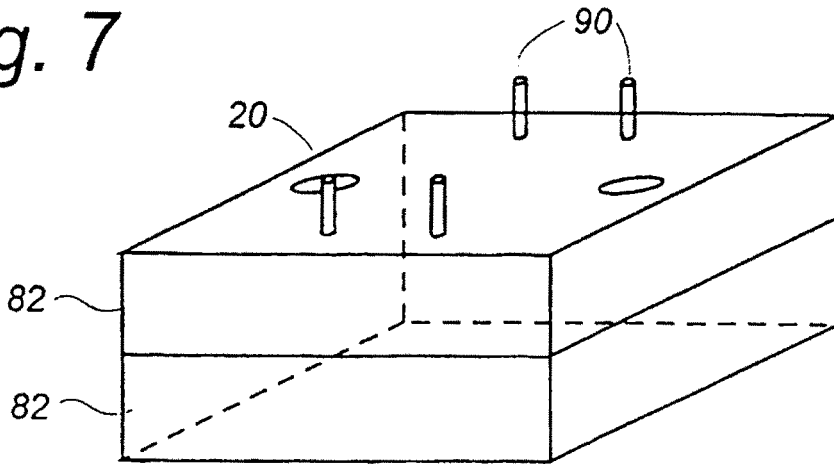


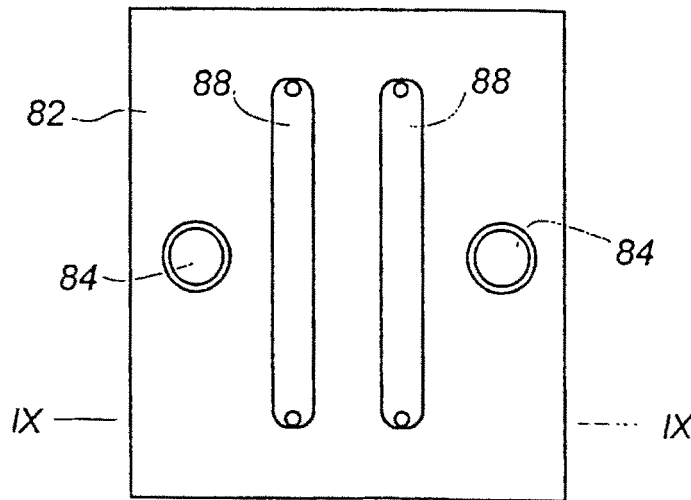
Fig. 6

Fig. 7



X

Fig. 8



X

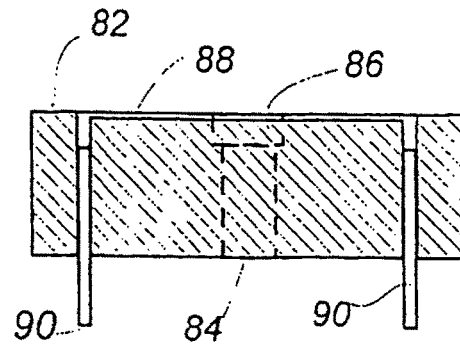
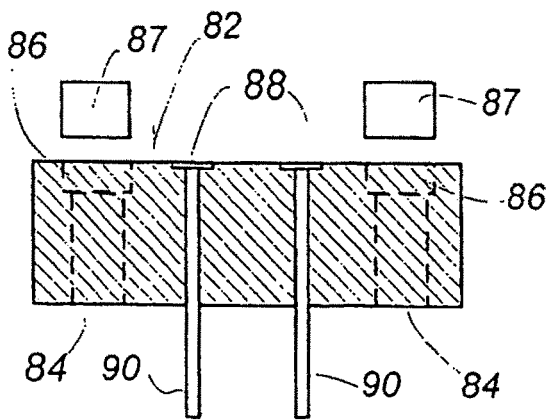


Fig. 9

Fig. 10

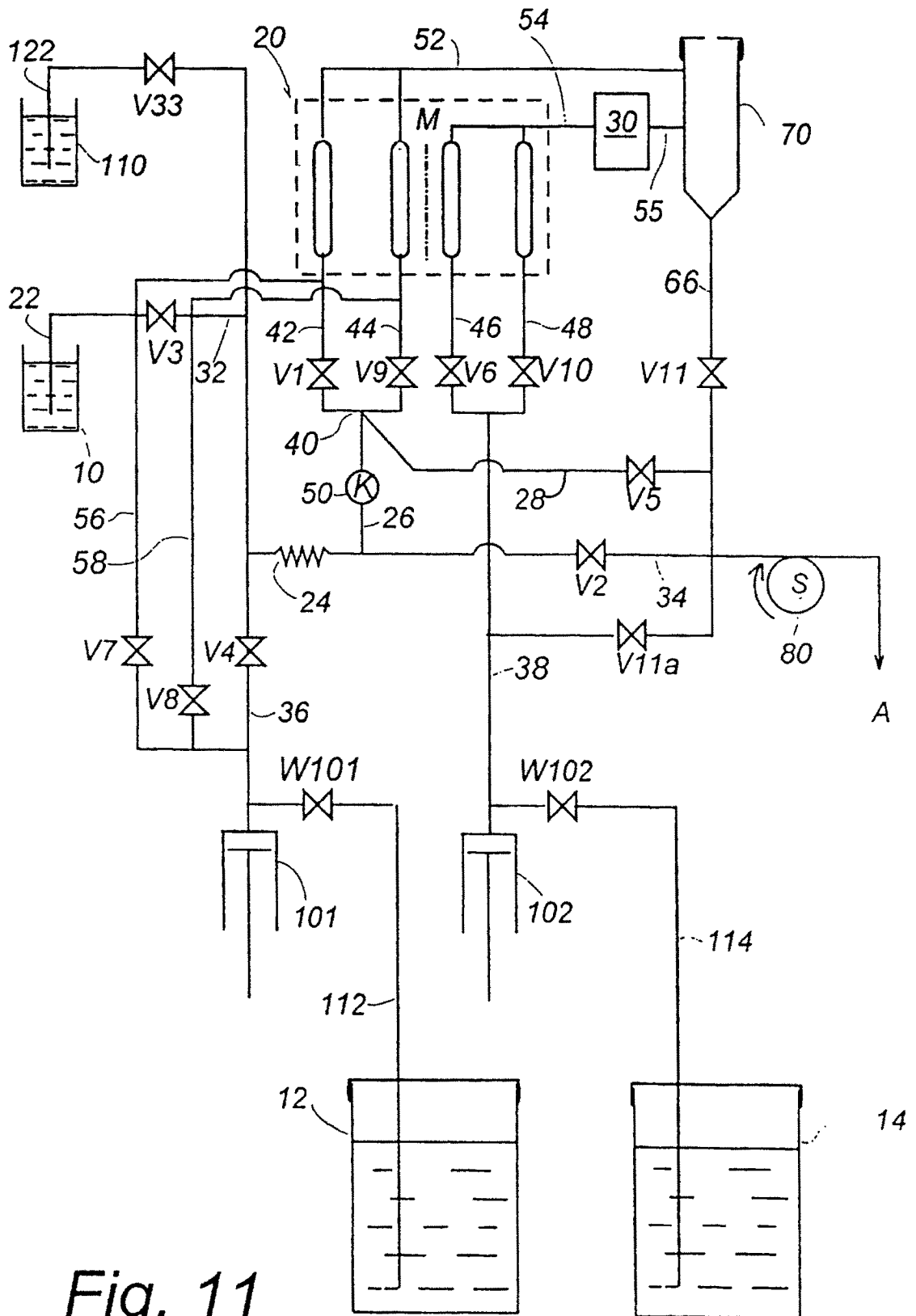


Fig. 11