

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 845 906**

51 Int. Cl.:

**B65D 1/40** (2006.01)  
**B01J 19/00** (2006.01)  
**B65D 90/02** (2009.01)  
**C09K 3/18** (2006.01)  
**B01L 3/00** (2006.01)  
**B05D 5/08** (2006.01)  
**B05D 1/00** (2006.01)  
**B05D 1/18** (2006.01)  
**C09D 5/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2014 PCT/CA2014/050016**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14107811**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2014 E 14737904 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 2943409**

54 Título: **Miembro reductor de menisco**

30 Prioridad:

**10.01.2013 US 201361751012 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.07.2021**

73 Titular/es:

**STEMCELL TECHNOLOGIES INC. (100.0%)  
570 West Seventh Avenue Suite 400  
Vancouver, British Columbia V5Z 1B3, CA**

72 Inventor/es:

**WOODSIDE, STEVEN y  
EGELER, OLIVER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 845 906 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**

Miembro reductor de menisco

Campo técnico

5 Los modos de realización descritos en el presente documento se refieren a recipientes para contener líquido y, en concreto, a placas de pocillos y, en concreto, a placas de pocillos configuradas para reducir la magnitud de la curvatura del menisco cuando se colocan líquidos acuosos dentro de los pocillos.

Antecedentes

10 El documento US 2010/0067105 (Egeler et al.) divulga un miembro reductor de menisco para su uso en un recipiente para contener un líquido que incluye una característica de la superficie que se superpone a al menos una porción de una superficie interior del recipiente. La característica de la superficie incluye al menos dos superficies para contactar con el líquido que cooperan para reducir la anchura de un menisco formado en una interfase entre el líquido y la característica de la superficie al alterar físicamente un ángulo de contacto entre el líquido y la característica de la superficie.

15 El documento US 2010/0047845 (Woodside et al.) divulga métodos para mejorar los ensayos de recipientes de cultivo celular. En un aspecto, la solicitud está dirigida a un método para reducir la curvatura del menisco que comprende aplicar un material de revestimiento a la pared interior del recipiente, en donde el material de revestimiento proporciona un ángulo de contacto de retroceso de aproximadamente 90 grados con soluciones acuosas y medios de cultivo. En otro aspecto, la solicitud está dirigida a un método de etiquetado de células en una primera solución generando gotitas de una segunda solución que contiene al menos un agente de etiquetado celular y permitiendo que las gotitas de la segunda solución entren en contacto con la superficie de la primera solución.

20 El documento US 2005/0244838 se refiere a aparatos y métodos para la detección en húmedo de ensayos de hibridación. Los diferentes tipos de paredes de contenedores proporcionan un menisco diferente. El documento US 2008/0141784 divulga un recipiente de agitación en el que se contiene líquido y se usa en un analizador para medir una propiedad del líquido. La porción de pared del recipiente está configurada de modo que una elevación del menisco es menor que una elevación del menisco formado por el líquido contenido en un recipiente supuesto cuya sección transversal en una dirección ortogonal a una dirección de profundidad de la porción rebajada es la misma que la de un rectángulo circunscrito. El rectángulo circunscrito se circunscribe alrededor de una porción, hecha del mismo material que una parte de la porción de pared donde se forma el menisco, donde se forma el menisco en la dirección relevante.

30 Resúmen

Este resúmen pretende introducir al lector en la descripción más detallada que sigue y no limitar ni definir ninguna invención reivindicada o aún no reivindicada. La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

35 Se describen modificaciones de la superficie física de la superficie de pared interior de los recipientes de cultivo celular que afectan a una magnitud de menisco reducida y una interferencia óptica disminuida resultante durante la formación de imágenes. El recipiente de cultivo celular puede ser cualquier recipiente, incluyendo, sin limitación, placas de cultivo celular o placas multipocillo.

40 De acuerdo con la invención, un miembro reductor de menisco para usar en un recipiente para contener un líquido incluye una característica de la superficie física que se superpone a al menos una porción de una superficie interior del recipiente para acoplarse a una superficie libre de un líquido en el recipiente, como se define en la reivindicación 4. La característica de la superficie física incluye una primera y una segunda superficies interiores que son generalmente paralelas y separadas entre sí y al menos una tercera superficie que se extiende entre la primera y la segunda superficies. La tercera superficie puede formar un ángulo y cruzarse tanto con la primera como con la segunda superficies. Las superficies primera, segunda y tercera están configuradas para alterar físicamente un ángulo de contacto de retroceso entre el líquido y la característica de la superficie física.

45 El ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco es de entre aproximadamente 75 grados y 110 grados.

El ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco es de entre aproximadamente 85 grados y 95 grados y, opcionalmente, puede ser aproximadamente 90 grados.

50 El ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la característica de la superficie física en ausencia del material de revestimiento.

El ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y una

porción de la superficie interior del recipiente revestido con el material de revestimiento en ausencia de la característica de la superficie física.

El material de revestimiento puede ser hidrófobo o superhidrófobo.

- 5 El ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto intrínseco formado entre el líquido y el miembro reductor de menisco.

La primera superficie interior está situada encima de la segunda superficie interior cuando el líquido está contenido en el recipiente y un borde de escalón está definido por la intersección de la segunda superficie interior y la tercera superficie.

- 10 La segunda superficie interior puede estar esencialmente libre de material de revestimiento.

La segunda superficie interior puede estar desplazada lateralmente hacia dentro desde la primera superficie interior.

La tercera superficie puede estar generalmente perpendicular tanto a la primera como a la segunda superficie interior.

La tercera superficie puede estar inclinada en un ángulo oblicuo con respecto a la primera y la segunda superficies interiores.

- 15 La tercera superficie puede ser esencialmente plana.

El material de revestimiento puede estar basado en silicona.

Un ángulo de contacto intrínseco formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más lejano de 90 grados que un ángulo de contacto intrínseco inalterado formado por el líquido y una porción de la superficie interior del recipiente.

- 20 El ángulo de contacto de retroceso entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto de retroceso inalterado medido entre el líquido y una porción de la superficie interior del recipiente.

El material de revestimiento puede incluir al menos 63% en peso de metil perfluorobutiletíl siloxano, metilhidrógeno siloxano, dimetil siloxano y metil vinil siloxano reticulados con una solución de reticulación que comprende al menos 60% en peso de metil (perfluorobutiletíl) siloxano terminado en trimetilsiloxi y metilhidrógeno siloxano terminado en trimetilsiloxi.

- 25 El material de revestimiento puede incluir al menos uno de un revestimiento a base de siloxano y un revestimiento a base de nanopartículas.

El material de revestimiento puede incluir al menos uno de Dehesive y FluoroPel.

- 30 De acuerdo con otro aspecto amplio de las enseñanzas descritas en el presente documento, que se puede usar en combinación con cualquier otro aspecto de las enseñanzas en el presente documento, un recipiente puede incluir una pared inferior cerrada y una pared lateral que se extiende desde la pared inferior hasta una porción superior abierta para retener un volumen de líquido dentro del recipiente. La pared lateral puede incluir una superficie interior. Una característica de la superficie física puede superponerse al menos a una porción de una superficie interior para acoplarse a una superficie libre de un líquido en el recipiente. La característica de la superficie física puede incluir una primera y una segunda superficies interiores que son generalmente paralelas a y separadas entre sí y al menos una tercera superficie que se extiende entre la primera y la segunda superficies. La tercera superficie puede cruzarse tanto con la primera como con la segunda superficies interiores. La primera superficie interior, la segunda superficie interior y la tercera superficie pueden configurarse para alterar físicamente un ángulo de contacto de retroceso entre el líquido y el miembro reductor de menisco. Puede aplicarse un material de revestimiento a la primera superficie interior y la tercera superficie de la característica de la superficie física. El material de revestimiento puede configurarse para alterar químicamente el ángulo de contacto de retroceso entre el líquido y la primera superficie interior y la tercera superficie de la característica de la superficie física que está revestida con el material de revestimiento, por lo que el ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco es de entre aproximadamente 75 grados y 110 grados.

- 45 La característica de la superficie física puede ser integral con la pared lateral del recipiente.

La característica de la superficie física puede estar dispuesta en un miembro de inserto separado configurado para ser recibido dentro del recipiente.

- 50 La característica de la superficie física puede extenderse continuamente alrededor de un perímetro interior del recipiente.

- La característica de la superficie puede extenderse alrededor de sólo una porción de un perímetro interior del recipiente.
- 5 El ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco es de entre aproximadamente 85 grados y 95 grados y, opcionalmente, puede ser de aproximadamente 90 grados.
- El ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la característica de la superficie física en ausencia del material de revestimiento.
- 10 El ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y una porción de la superficie interior del recipiente revestido con el material de revestimiento en ausencia de la característica de la superficie física.
- El material de revestimiento puede ser hidrófobo o superhidrófobo.
- 15 El ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto intrínseco formado entre el líquido y el miembro reductor de menisco.
- La primera superficie interior puede estar situada por encima de la segunda superficie interior cuando el líquido está contenido en el recipiente y un borde de escalón está definido por la intersección de la segunda superficie interior y la tercera superficie.
- 20 La segunda superficie interior puede estar esencialmente libre de material de revestimiento.
- La segunda superficie interior puede estar desplazada lateralmente hacia dentro desde la primera superficie interior.
- La tercera superficie puede ser generalmente perpendicular tanto a la primera como a la segunda superficies interiores.
- La tercera superficie puede estar inclinada en un ángulo oblicuo con respecto a la primera y la segunda superficies interiores.
- 25 La tercera superficie puede ser esencialmente plana.
- El material de revestimiento puede estar basado en silicona.
- Un ángulo de contacto intrínseco formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más lejano de 90 grados que un ángulo de contacto intrínseco inalterado formado por el líquido y una porción de la superficie interior del recipiente.
- 30 El ángulo de contacto de retroceso entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto de retroceso inalterado medido entre el líquido y una porción de la superficie interior del recipiente.
- 35 El material de revestimiento puede incluir al menos 63% en peso de metil perfluorobutiletíl siloxano, metilhidrógeno siloxano, dimetil siloxano y metil vinil siloxano reticulados con una solución de reticulación que comprende al menos 60% en peso de metil (perfluorobutiletíl) siloxano terminado en trimetilsiloxi y metilhidrógeno siloxano terminado en trimetilsiloxi.
- El material de revestimiento puede incluir al menos uno de entre un revestimiento a base de siloxano y un revestimiento a base de nanopartículas.
- El material de revestimiento puede incluir al menos uno de Dehesive y FluoroPel.
- 40 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para proporcionar un miembro reductor de menisco para su uso en un recipiente para contener un líquido como se define en la reivindicación adjunta 1. Otras características opcionales del método se enumeran en las reclamaciones dependientes asociadas.
- 45 El método también puede incluir girar la característica de la superficie física alrededor de un eje de giro mientras se aplica el material de revestimiento a al menos una de la primera superficie interior, la segunda superficie interior y la tercera superficie.
- El eje de giro puede estar en un ángulo de entre aproximadamente 0 grados y aproximadamente 5 grados a un eje vertical.
- La característica de la superficie física se puede girar alrededor del eje de giro a una velocidad de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25 revoluciones por minuto.

El método también puede incluir mezclar el material de revestimiento con un disolvente antes de aplicar el material de revestimiento a la primera superficie interior y la tercera superficie para reducir la viscosidad del material de revestimiento.

5 El método también puede incluir las etapas de evaporar al menos una porción del disolvente y curar el material de revestimiento que queda sobre la primera superficie interior y la tercera superficie.

El material de revestimiento se puede aplicar como una capa generalmente continua de material de revestimiento sobre la primera superficie interior y la tercera superficie.

10 El método también puede incluir las etapas de trasladar axialmente el miembro reductor de menisco mientras se aplica la capa generalmente continua de material de revestimiento para proporcionar una capa generalmente helicoidal de material de revestimiento en la primera superficie interior y la tercera superficie.

El material de revestimiento puede ser hidrófobo o superhidrófobo.

El material de revestimiento puede incluir al menos uno de entre un revestimiento a base de siloxano, un revestimiento a base de nanopartículas, Dehesive y FluoroPel.

15 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un miembro reductor de menisco para su uso en un recipiente como se define en la reivindicación adjunta 4. Otras características opcionales se enumeran en las reivindicaciones dependientes asociadas.

20 Se aplica un material de revestimiento a la primera superficie interior y a la tercera superficie de la característica de la superficie física para alterar químicamente el ángulo de contacto de retroceso entre el líquido y la primera superficie interior y la tercera superficie de la característica de la superficie física que está revestida con el material de revestimiento. Un ángulo de interfase formado entre el líquido donde entra en contacto con el miembro reductor de menisco y un plano paralelo a la primera superficie interior es de entre aproximadamente 75 grados y 110 grados.

El ángulo de interfase formado entre el líquido donde entra en contacto con el miembro reductor de menisco y un plano paralelo a la primera superficie interior puede ser de entre aproximadamente 85 grados y 95 grados y opcionalmente puede ser aproximadamente 90 grados.

25 El ángulo de interfase formado entre el líquido donde entra en contacto con el miembro reductor de menisco y un plano paralelo a la primera superficie interior puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y la característica de la superficie física en ausencia del material de revestimiento.

30 El ángulo de interfase formado entre el líquido donde entra en contacto con el miembro reductor de menisco y un plano paralelo a la primera superficie interior puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto de retroceso formado entre el líquido y una porción de la superficie interior del recipiente revestido con el material de revestimiento en ausencia de la característica de la superficie física.

El material de revestimiento puede ser hidrófobo o superhidrófobo.

35 El ángulo de interfase formado entre el líquido donde entra en contacto con el miembro reductor de menisco y un plano paralelo a la primera superficie interior puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto intrínseco formado entre el líquido y el miembro reductor de menisco.

La primera superficie interior está situada por encima de la segunda superficie interior cuando el líquido está contenido en el recipiente y un borde de escalón está definido por la intersección de la segunda superficie interior y la tercera superficie.

La segunda superficie interior puede estar esencialmente libre de material de revestimiento.

40 La segunda superficie interior puede estar desplazada lateralmente hacia dentro desde la primera superficie interior.

La tercera superficie puede estar generalmente perpendicular tanto a la primera como a la segunda superficie interior.

La tercera superficie puede estar inclinada en un ángulo oblicuo con respecto a la primera y la segunda superficies interiores.

La tercera superficie puede ser esencialmente plana.

45 El material de revestimiento puede estar basado en silicona.

Un ángulo de contacto intrínseco formado entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más lejano de 90 grados que un ángulo de contacto intrínseco inalterado formado por el líquido y una porción de la superficie interior del recipiente.

El ángulo de contacto de retroceso entre el líquido y la primera superficie interior del miembro reductor de menisco puede estar más cerca de 90 grados que un ángulo de contacto de retroceso inalterado medido entre el líquido y una porción de la superficie interior del recipiente.

5 El material de revestimiento puede incluir al menos 63% en peso de metil perfluorobutiletíl siloxano, metilhidrógeno siloxano, dimetil siloxano y metil vinil siloxano reticulados con una solución de reticulación que comprende al menos 60% en peso de metil (perfluorobutiletíl) siloxano terminado en trimetilsiloxi y metilhidrógeno siloxano terminado en trimetilsiloxi.

El material de revestimiento puede incluir al menos uno de entre un revestimiento a base de siloxano y un revestimiento a base de nanopartículas.

10 El material de revestimiento puede incluir al menos uno de Dehesive y FluoroPel.

#### Dibujos

La figura 1a es una vista en sección transversal de un recipiente que contiene un fluido que tiene un ángulo de contacto menor de 90 grados;

15 La figura 1b es una vista en sección transversal de un recipiente que contiene un fluido que tiene un ángulo de contacto igual a 90 grados;

La figura 1c es una vista en sección transversal de un recipiente que contiene un fluido que tiene un ángulo de contacto mayor de 90 grados;

La figura 2 es una ilustración de una gotita de líquido sobre una superficie que define un ángulo de contacto;

20 La figura 3 es una vista en sección transversal de un recipiente que incluye un miembro reductor de menisco que tiene una característica de la superficie de tipo escalón plana;

La figura 4 es una vista en sección transversal de un recipiente que incluye un miembro reductor de menisco que tiene una característica de la superficie de tipo escalón inclinada;

La figura 5 es una vista en sección transversal de un inserto para un recipiente que incluye un miembro reductor de menisco que tiene una característica de la superficie de tipo escalón plana;

25 La figura 6 es una vista en sección transversal de un inserto para un recipiente que incluye un miembro reductor de menisco que tiene una característica de la superficie de tipo escalón inclinada;

La figura 7 es un gráfico que muestra el % de cobertura de menisco para pocillos en una placa de 6 pocillos que tiene un inserto en la pared del pocillo revestido con un material de revestimiento.

30 La figura 8 es un gráfico que muestra el % de cobertura de menisco para pocillos en una placa de 6 pocillos con una característica de escalón integral y revestida con un material de revestimiento por encima del escalón.

#### Descripción detallada

35 Se describirán a continuación varios aparatos o procesos para proporcionar un ejemplo de un modo de realización de cada invención reivindicada. Ningún modo de realización descrito a continuación limita cualquier invención reivindicada y cualquier invención reivindicada puede cubrir procesos o aparatos que difieran de los descritos a continuación. Las invenciones reivindicadas no se limitan a aparatos o procesos que tengan todas las características de cualquier aparato o proceso descrito a continuación o características comunes a múltiples o todos los aparatos descritos a continuación. Es posible que un aparato o proceso descrito a continuación no sea un modo de realización de ninguna invención reivindicada. Cualquier invención divulgada en un aparato o proceso descrito a continuación que no se reivindique en este documento puede ser la materia de otro instrumento de protección, por ejemplo, una solicitud de patente posterior, y los solicitantes, inventores o propietarios no tienen la intención de abandonar, negar o dedicar al público cualquier invención de este tipo mediante su divulgación en este documento.

45 Cuando se coloca un líquido sobre una superficie sólida, la superficie del líquido adquiere una forma característica de las propiedades fisicoquímicas de las tres fases implicadas (sólida, líquida y vaporosa). El ángulo definido por las superficies líquida y sólida en el punto de contacto de las tres fases se denomina "ángulo de contacto" ( $\theta$ ). La magnitud de este ángulo está determinada por las energías libres interfaciales (tensión superficial,  $\gamma$ ) de la interfase líquido-vapor (LV), la interfase líquido-sólido (LS) y la interfase sólido-vapor (SV). En el caso de líquidos colocados dentro de una placa o pocillo de una placa de pocillos múltiples, se produce un menisco cuando el ángulo de contacto entre el líquido y la superficie sólida es distinto de 90 grados. Cuando el ángulo de contacto es menor de 90 grados, se forma un menisco cóncavo, y cuando el ángulo de contacto es mayor de 90 grados, se forma un menisco convexo.

50 Debido a las propiedades del ángulo de contacto definidas anteriormente, las energías superficiales de la solución y las interfases sólidas que la contienen se citan a menudo como propiedades definitorias que determinan la forma y

5 magnitud del menisco (por ejemplo, ancho, alto y/o % de área del menisco). Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas, además de las energías superficiales de las superficies líquida y sólida, son importantes para determinar la forma del menisco de los líquidos acuosos en equilibrio. Dichas propiedades incluyen (a) la topología tridimensional de la superficie sólida, (b) la composición de la fase líquida, (c) la heterogeneidad física y química de la superficie sólida, y (d) la inducibilidad de cambios configuracionales de la superficie sólida por el líquido. Esto provoca una histéresis en los ángulos de contacto que dependen de las interacciones de las propiedades de la superficie mencionadas anteriormente, lo que dificulta la estimación teórica de la magnitud del menisco basándose en las químicas de la superficie. Los inventores no conocen actualmente ninguna teoría universal que modele con precisión el ángulo de contacto en sistemas complejos y, por tanto, la histéresis del ángulo de contacto y el menisco resultante se determinan habitualmente de manera empírica para diferentes combinaciones de líquido/sólido.

10 Un menisco puede presentar un problema para la formación de imágenes ópticas de los objetos presentes dentro de un recipiente, placa o pocillo que contenga líquido por varias razones. La curvatura de la superficie del líquido provocará la refracción y el reflejo de la luz de iluminación y dará como resultado una interferencia óptica dentro del área del menisco. Además, el menisco da como resultado un cambio en la profundidad del líquido cerca de las superficies sólidas y puede causar una distribución desigual de los objetos cerca de la pared de la placa o pocillo.

15 Se han utilizado varios métodos para compensar los efectos del menisco en microscopía digital. Las observaciones se pueden limitar a las porciones centrales de un pocillo o se puede aumentar la exposición a la luz cuando se toman imágenes dentro del menisco. También se han utilizado barreras físicas, como cubreobjetos, para comprimir el menisco. Sin embargo, dichos métodos son complicados y pueden reducir el área de la imagen muestreada de modo que omita áreas relevantes de cultivos celulares y convierta el método en no cuantitativo.

20 Una técnica para mitigar la formación de menisco es aplicar un revestimiento a una pared del recipiente que de otra manera sería lisa que proporcione propiedades de la superficie deseables en la interfase líquido-sólido entre una superficie de pared revestida concreta y un líquido concreto para dar como resultado un ángulo de contacto mínimo dinámico de aproximadamente 90 grados. Sin embargo, debido a que estas propiedades de la superficie de la interfase líquido-sólido dependen de las complejas interacciones entre las propiedades fisicoquímicas del líquido, así como la heterogeneidad química y física de la superficie sólida, se requerirían diferentes polímeros de pared o revestimientos superficiales para líquidos con propiedades diferentes. Además, puede ser difícil aplicar el revestimiento solo a la pared del recipiente, sin que el revestimiento llegue al fondo del recipiente. Revestir el fondo del recipiente puede resultar en un humedecido incompleto del fondo del recipiente, lo que luego provocará un fuerte menisco cóncavo e interferirá con la microscopía.

25 Otra técnica para mitigar la formación de menisco es crear características físicas en la pared del recipiente que provoquen que el menisco se mantenga a un nivel específico, o mediante la creación de zonas de menisco convexo y cóncavo alternas que dan como resultado un menisco plano eficaz al evaluar la interferencia óptica. Una desventaja de la primera solución puede ser que la reducción de menisco sólo funciona para un volumen de fluido específico y puede presentar formación de menisco si la pared sobre la característica está humedecida por el fluido, como ocurre durante la manipulación rutinaria de los recipientes de cultivo. Una desventaja de esta última solución es que la fabricación puede ser compleja.

30 Un método que sea eficaz para reducir la magnitud del menisco con una amplia variedad de soluciones acuosas que tengan varias energías superficiales, y donde el menisco reducido se mantenga durante la manipulación rutinaria, sería ventajoso para muchas aplicaciones biológicas y de imagen.

35 Para una superficie óptima y homogénea, la magnitud del ángulo de contacto teórico o intrínseco viene determinada por la ecuación de Young:

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (1)$$

40 Para los fines de la presente solicitud, se considera que la fase líquida es una solución acuosa, en concreto soluciones acuosas viscosas que comprenden biopolímeros como proteínas, péptidos y polisacáridos o medios de cultivo celular.

45 Como se explicó en detalle anteriormente, las propiedades que pueden afectar el ángulo de contacto formado entre un líquido y una superficie sólida pueden incluir (a) la topología tridimensional de la superficie sólida, (b) la composición de la fase líquida, (c) heterogeneidad física y química de la superficie sólida, y (d) inducibilidad de cambios configuracionales de la superficie sólida por el líquido. Las propiedades (c) y (d) anteriores influyen en la forma del menisco al causar histéresis del ángulo de contacto, definida como la discrepancia entre los ángulos de contacto máximo y mínimo observados para una gota de líquido cuando el punto de contacto de las fases líquida, sólida y vaporosa se avanza y retrocede a través de la superficie sólida. Cuando el líquido avanza sobre la superficie sólida, se observa que el ángulo de contacto es mayor que cuando el líquido retrocede de la superficie sólida. Estos ángulos de contacto de "avance" y "retroceso" se toman como los ángulos de contacto máximo dinámico y mínimo dinámico, respectivamente, y su diferencia se denomina histéresis del ángulo de contacto. Esta histéresis es causada por las energías necesarias para superar la heterogeneidad en los dominios hidrófobos e hidrófilos en la superficie (heterogeneidad química), o superar las barreras físicas en la superficie sólida (heterogeneidad física o "rugosidad" superficial).

En el caso de heterogeneidad química, a medida que una solución acuosa avanza sobre una superficie, los dominios hidrófobos en la superficie impedirán el movimiento de la solución y darán como resultado un aumento del ángulo de contacto, mientras que cuando la solución retrocede de la superficie, Los dominios hidrófilos en la superficie retendrán el líquido en la superficie, lo que resultará en un ángulo de contacto aumentado.

- 5 En el caso de heterogeneidad física, las variaciones microscópicas en la superficie impedirán el movimiento de la solución proporcionando resistencia al frente de avance del líquido (aumentando por tanto el ángulo de contacto) y retendrán el límite de retroceso de la superficie líquida-sólida a medida que el líquido retrocede (disminuyendo por tanto el ángulo de contacto).

10 Los cambios de configuración de la superficie sólida provocados por el contacto con la fase líquida introducen histéresis adicional en los ángulos de contacto observados. El cambio en la configuración de la superficie es el resultado de la reorientación de los grupos funcionales en una superficie sólida polimérica cuando se expone al líquido para minimizar la tensión interfacial en la superficie entre las fases sólida y líquida. Se cree que esta reorientación consiste principalmente en un giro de los grupos funcionales superficiales alrededor del eje molecular, más que en una reordenación de la estructura macromolecular del polímero. El resultado es que las porciones de la superficie  
15 sólida que se han expuesto a la fase líquida (es decir, se han "humedecido") presentarán una energía superficial alterada. En el caso de líquidos acuosos en contacto con la superficie de un polímero hidrófobo sólido, se espera que la superficie húmeda presente una hidrofobicidad reducida en comparación con las superficies no húmedas, debido al giro de restos hidrófobos lejos de la superficie. Por tanto, cuando la fase líquida retrocede sobre una superficie húmeda, se produce un ángulo de contacto reducido en comparación con el ángulo de contacto estático del líquido sobre superficies no húmedas. Esto contribuye además a la alteración de la magnitud de un ángulo de contacto en retroceso.

Es probable que la composición de la solución acuosa afecte a la histéresis del ángulo de contacto. Por ejemplo, la presencia de componentes que modulan las interacciones hidrófobas e hidrófilas entre las superficies líquida y sólida, o alteran las energías superficiales de las interfases líquido-vapor y líquido-sólido probablemente afecten a la histéresis. Se puede esperar que la presencia de moléculas con zonas polares y no polares, como tensioactivos,  
25 fosfolípidos o ácidos grasos, module las interacciones entre restos hidrófobos e hidrófilos en la superficie sólida y el líquido acuoso. Dichas moléculas también pueden ejercer efectos variables sobre la configuración de los grupos funcionales superficiales de la fase sólida, alterando aún más el ángulo de contacto. Además, los componentes solubilizados pueden adherirse a la superficie sólida, alterando su energía superficial y afectando el ángulo de contacto. Por ejemplo, se ha demostrado que las soluciones que contienen albúmina afectan los ángulos de contacto de la solución con superficies hidrófobas debido a la adsorción de proteínas a la superficie. Además, la composición de la solución acuosa puede afectar la viscosidad del líquido y, por lo tanto, la energía requerida para devolver el sistema a su estado de equilibrio después de una perturbación física (es decir, las soluciones muy viscosas dan como resultado ángulos de contacto alterados en equilibrio, en comparación con soluciones similares de menor viscosidad).

Los ángulos de contacto de avance y retroceso se determinan comúnmente mediante uno de dos métodos: (1) El  
35 método de gota sésil mediante el cual se coloca una gota de la fase líquida sobre la superficie sólida. En este caso, el ángulo de avance se obtiene agregando volumen a la gota y un ángulo de retroceso se obtiene eliminando volumen de la gota. (2) El método de la placa de Wilhelmy, mediante el cual una superficie polimérica se sumerge lentamente en la fase líquida (lo que da como resultado el ángulo de contacto de avance) y luego se retira de la superficie (lo que resulta en el ángulo de contacto de retroceso). Estos métodos dan como resultado diferentes ángulos de contacto  
40 absolutos, debido a que el método de gota sésil tiene una superficie horizontal estacionaria y el método de placa de Wilhelmy tiene una superficie vertical móvil.

Para mayor claridad, la formación de menisco de un líquido se expondrá en un tubo cilíndrico, aunque los aspectos mencionados anteriormente del ángulo de contacto y el menisco se aplican a recipientes de una variedad de formas (por ejemplo, tubos cuadrados, redondos o triangulares, pocillos u otros recipientes). Normalmente, cuando se coloca una solución acuosa en un cilindro hidrófobo, la forma del menisco viene dictada por el ángulo de contacto de avance a medida que aumenta el nivel del líquido dentro del cilindro. Para una superficie óptima homogénea, cuando se completa la adición del líquido, la forma del menisco llegará al equilibrio dictado por el ángulo de contacto intrínseco del sistema definido por la ecuación de Young (arriba). Sin embargo, en aplicaciones del mundo real, las superficies homogéneas óptimas son poco probables. Por tanto, la histéresis del ángulo de contacto entrará en juego si el sistema  
50 no es completamente estático. Además, cualquier alteración física del contenedor, como vibración, giro o aceleración/desaceleración debido al movimiento del contenedor, puede resultar en el movimiento del nivel del líquido y la línea de contacto trifásica (es decir, la intersección de las fases sólida, líquida y vaporosa) estará sujeta a un ciclo de ángulos de contacto de avance y retroceso. Después de dicho ciclo, se establece un nuevo ángulo de contacto de equilibrio. El nuevo ángulo de contacto de equilibrio puede no estar representado por el ángulo de contacto intrínseco de Young, sino que puede estar representado por el ángulo de contacto de retroceso de la solución en la superficie húmeda. Actualmente, los inventores no conocen ninguna teoría universal que modele con precisión este ángulo de contacto en sistemas complejos y, por lo tanto, el ángulo de contacto de retroceso y el menisco resultante se determinan mejor empíricamente para diferentes sistemas (véanse los ejemplos a continuación).

60 Generalmente, en un sistema completamente estático para soluciones acuosas normales contenidas en superficies sólidas, la forma del menisco está definida por el ángulo de contacto intrínseco como predice la ecuación de Young. Sin embargo, estos sistemas estáticos se encuentran muy raramente en las tareas rutinarias de laboratorio,

especialmente porque los procedimientos que involucran soluciones comúnmente requieren una mezcla física después de agregarlos a un recipiente. En el escenario más común, donde la superficie del líquido está sujeta a alteraciones físicas, la forma del menisco es sensible a la histéresis del ángulo de contacto, la topología de la superficie de la pared interior del recipiente y la composición de la solución acuosa. Se cree que el ángulo de contacto de retroceso del sistema es el indicador principal de la forma y magnitud del menisco en condiciones de trabajo reales. Por consiguiente, mientras que un ángulo de contacto intrínseco de 90 grados será característico de un menisco perfectamente plano en un sistema completamente estático, se requiere un ángulo de contacto de retroceso de 90 grados para mantener un menisco plano en un sistema sujeto a perturbaciones físicas, como se encuentra comúnmente en la mayoría de las aplicaciones del mundo real.

Una limitación de los recipientes de ensayo y las placas de pocillos actuales es que el menisco sobre el medio en la circunferencia de la placa o pocillo provoca una distorsión óptica alrededor de la circunferencia de la placa. En esta área, es más difícil ver las células o colonias usando un microscopio de luz visible en modo de transmisión de luz visible o campo oscuro o en modo fluorescente. Las imágenes adquiridas con una cámara y ópticas estáticas, o con ópticas en movimiento, como en un escáner, muestran el efecto menisco. La capacidad de reconocimiento de patrones del cerebro humano puede manejar el fondo variable y los observadores humanos pueden identificar las entidades en las imágenes o bajo un microscopio. Sin embargo, es más fácil identificar las entidades donde no hay menisco. Además, el análisis de imágenes por ordenador es mucho más complicado cuando el fondo es variable porque los enfoques comunes usan la diferencia de intensidad o brillo entre el fondo y el primer plano para distinguir los objetos. Por tanto, existe la ventaja de eliminar la interferencia óptica debida al menisco para la formación de imágenes tanto manual como automatizada de células y otras entidades en los pocillos de cultivo o recipientes de cultivo. Esta ventaja se extendería a cualquier ensayo donde se realicen mediciones u observaciones ópticas o espectroscópicas, incluyendo, por ejemplo, ensayos basados en fluorescencia, luz ultravioleta, luz infrarroja y luz visible.

Se ha demostrado que si las paredes verticales de un recipiente de cultivo presentan energías superficiales que resultan en un ángulo de contacto intrínseco de aproximadamente 90 grados, la magnitud del menisco del medio de cultivo se minimiza, lo que a su vez reduce el reborde oscuro visto generalmente alrededor del borde del recipiente de cultivo. Además, se ha demostrado que la alteración física de las soluciones acuosas comunes y los medios de cultivo dentro del recipiente de cultivo da como resultado la formación de un menisco. Esto se debe a la histéresis del ángulo de contacto presentada comúnmente con interfases de soluciones acuosas y superficies sólidas.

También se ha demostrado que si las paredes de los recipientes de cultivo se tratan de modo que proporcionen un ángulo de contacto de retroceso de aproximadamente 90 grados, las características de reducción de menisco de las superficies son resistentes a las alteraciones físicas e incubación prolongada. Esto mejora la capacidad de los operadores manuales y los sistemas automatizados para distinguir entidades cercanas al reborde del recipiente de cultivo.

Haciendo referencia a las figuras 1a-1c, se ilustra un ejemplo de un recipiente 100 que contiene un líquido 102. Para mayor claridad y facilidad de descripción, en esta solicitud, el recipiente 100 se describe como un recipiente o tubo cilíndrico que tiene una pared 104 lateral y un fondo 106 expone la formación de menisco del líquido en un tubo cilíndrico que comprende la fase sólida. Sin embargo, ha de entenderse que el recipiente 100 puede tener cualquier forma adecuada (por ejemplo, tubos, pocillos cuadrados, redondos o triangulares u otros contenedores) y puede tener un número mayor o menor de paredes 104 laterales (por ejemplo, un contenedor cuadrado podría tener cuatro paredes laterales ortogonales). Aunque las paredes 104 laterales del recipiente se ilustran como verticales, ha de entenderse que en algunos ejemplos al menos una porción de cada pared 104 lateral puede estar inclinada, curvada o de otra forma. Las paredes 104 laterales comprenden además una superficie 105 interna o interior para entrar en contacto con el líquido 102 retenido en el recipiente 100.

En el presente ejemplo, el fondo 106 del recipiente es plano, como se ilustra, mientras que en otros ejemplos el fondo 106 del recipiente puede ser inclinado, cóncavo, convexo o de cualquier otra forma adecuada. Independientemente de la forma actual del fondo 106 del recipiente, el recipiente 100 define un plano 108 inferior que está separado del extremo superior del recipiente 110 y se cruza con las paredes 104 laterales del recipiente en la misma orientación que el fondo 106 plano del recipiente. En el presente ejemplo, el fondo 106 del recipiente se encuentra dentro del plano 108 inferior. En otros ejemplos que tienen fondos no planos, el fondo 106 del recipiente puede no coincidir con el plano 108 inferior.

El recipiente 100 puede construirse con cualquier material adecuado. Opcionalmente, el material puede seleccionarse de manera que sea adecuado para la introducción de topologías de micro-superficie o la aplicación de revestimientos superficiales hidrófilos, hidrófobos y superhidrófobos. Ejemplos de materiales adecuados incluyen materiales poliméricos, poliestireno, polipropileno, policarbonato, cloruro de polivinilo, politetrafluoroetileno u otra poliolefina adecuada o sustrato polimérico sólido similar.

Los materiales de revestimiento hidrófobos podrían ser, por ejemplo, a base de silicona, a base de fluoropolímero, vaselina o cera de parafina. Los revestimientos superhidrófobos podrían consistir en películas nanoestructuradas, por ejemplo, películas de nanotubos compuestos de sílice, carbono o polímeros de perfluorocarbono. Dichos revestimientos se conocen en la técnica como "alfombras", "bosques" o "películas" de nanotubos. Las películas

nanoestructuradas también podrían consistir en otros montajes moleculares organizados de manera regular o irregular que den como resultado superficies nanorreformadas.

Como se ejemplifica, el recipiente 100 está configurado para retener un volumen de líquido 102. El líquido 102 tiene una superficie libre o superficie 114 superior que tiene una tensión superficial del líquido. Las propiedades y características de la tensión superficial del líquido pueden depender de la composición del líquido. Ejemplos de líquidos 102 que pueden estar contenidos dentro del recipiente 100 incluyen soluciones acuosas de sales, azúcares, proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, metilcelulosa, agar, colágeno u otros agentes gelificantes similares.

Haciendo referencia a la figura 1a, en la interfase entre la superficie 105 interior de la pared 104 lateral del recipiente y la superficie libre del líquido 114, las porciones periféricas de la superficie del líquido pueden acoplarse con la superficie 105 interior del recipiente 100 a un nivel diferente dentro del recipiente 100 que el nivel de la superficie 114 libre. La diferencia en el nivel de la superficie entre la superficie 114 libre y la interfase de la pared lateral del líquido se denomina menisco 118 que tiene una magnitud 120 del menisco. La distancia desde la superficie 105 interior hasta el punto donde la superficie 114 líquida es esencialmente plana define un ancho 121 de menisco. El ángulo entre la pared 104 lateral del recipiente y la superficie del líquido en la zona del menisco 118 define un ángulo 116 de contacto. Si el ángulo 116 de contacto es menor de 90 grados, como se muestra en figura 1a, el menisco se considera un menisco 118 cóncavo. Si el ángulo de contacto es mayor de 90 grados, como se muestra en la figura 1c, el menisco se considera un menisco 118 convexo. Si el ángulo de contacto es igual a 90 grados, como se muestra en la figura 1b, la magnitud 120 del menisco (mostrada en las figuras 1a y 1c) es cero, el ancho 121 del menisco es cero y el líquido se describe como que no tiene menisco 118.

Para una interfase líquido/sólido determinada (es decir, la interfase entre el líquido 102 y la pared 104 lateral), la magnitud 120 del menisco formado puede alterarse modificando el ángulo 116 de contacto creado entre el líquido 102 y la pared 104 lateral. La presente solicitud se refiere a un miembro reductor de menisco que altera físicamente el ángulo 116 de contacto formado entre el líquido 102 y el miembro reductor de menisco de modo que el ángulo 116 de contacto entre el líquido 102 y el miembro reductor de menisco está más cerca de 90 grados que el ángulo 116 de contacto entre el líquido 102 y el material de la pared 104 lateral original. La reducción de la magnitud 120 del menisco alterando el ángulo 116 de contacto entre el líquido 102 y la pared 104 lateral puede entenderse como que compensa los efectos del ángulo de contacto o compensa el ángulo de contacto entre el líquido 102 y una superficie.

Un ejemplo de un método para medir el ángulo 116 de contacto entre un líquido 102 y una superficie 122 sólida se describe haciendo referencia a la figura 2. La figura 2 ilustra una gota 102 de líquido que reposa sobre una superficie 122 esencialmente horizontal. Para cuantificar los ángulos 116 de contacto en las interfases de tres fases (sustrato sólido-líquido acuoso-aire), se situó lentamente una gotita de 20 $\mu$ L del líquido 102 sobre la superficie 122. Imágenes de vista lateral de la gotita 102 en reposo en la superficie fueron capturadas con el uso de una cámara digital Lumenera y una lente de aumento de 0,6x. La lente se orientó horizontalmente orientada hacia la gota 102, a un nivel uniforme con la superficie 122 sólida. La iluminación se proporcionó mediante retroiluminación con un LED ámbar detrás de un difusor opaco. Las condiciones de captura de imágenes se mantuvieron en configuraciones constantes (Ganancia 1, exposición 0,3s, resolución de adquisición 2080X1536). Los ángulos 116 de contacto mínimos dinámicos se determinaron mediante captura de imágenes después de aumentar el volumen de la gotita a 40 $\mu$ L y después eliminando 20 $\mu$ L para retroceder la línea de contacto sobre la superficie. Las imágenes se capturaron entre 2 y 5 segundos después de la manipulación de la gotita 102.

El ángulo 116 de contacto se determinó mediante el análisis de imágenes de vista lateral. De manera breve, el plano horizontal (línea de base de la gotita) de la imagen se estableció dibujando una línea 124 recta a través de los puntos de contacto de las gotitas con la superficie 122. Se dibuja un círculo 126 de mejor ajuste a través de los puntos perimetrales de la gotita 102 cerca de los puntos 128 de contacto de los márgenes izquierdo y derecho de la gotita 102 con la superficie. Este círculo 126 está destinado a ajustarse mejor a la curvatura de la superficie de la gotita 102 cerca del punto 128 de contacto. El ángulo entre 124 y la línea 130 tangente al círculo 126 de mejor ajuste en el punto 128 de contacto se toma como el ángulo 116 de contacto.

Para una interfase líquido/sólido determinada (es decir, la interfase entre el líquido 102 y la pared 104 lateral), la magnitud 120 del menisco formado puede alterarse modificando el ángulo 116 de contacto creado entre el líquido 102 y la pared 104 lateral. La presente solicitud se refiere a un miembro reductor de menisco que altera físicamente el ángulo 116 de contacto formado entre el líquido 102 y el miembro reductor de menisco de modo que el ángulo 116 de contacto entre el líquido 102 y el miembro reductor de menisco está más cerca de 90 grados que el ángulo 116 de contacto entre el líquido 102 y el material de la pared 104 lateral original. La reducción de la magnitud 120 del menisco alterando el ángulo 116 de contacto entre el líquido 102 y la pared 104 lateral puede entenderse como que compensa los efectos del ángulo de contacto o compensa el ángulo de contacto entre el líquido 102 y una superficie.

Un aspecto de las enseñanzas del presente documento se refiere a un miembro reductor de menisco que incluye modificar la composición química de la superficie de la pared polimérica o proporcionar un material de revestimiento en las superficies de la pared interior del recipiente de cultivo, para modificar químicamente el ángulo de contacto entre el líquido y las superficies de la pared interior para ayudar a proporcionar un ángulo de contacto de retroceso de entre aproximadamente 75 y aproximadamente 105 grados, y preferiblemente de entre aproximadamente 80 y

aproximadamente 100 grados, y más preferiblemente de aproximadamente 90 grados con soluciones acuosas y medios de cultivo.

Además de modificar la composición química de la superficie de la pared polimérica o los revestimientos de la superficie para la reducción de la formación de menisco, otro aspecto de las enseñanzas descritas en el presente documento se refiere a miembros reductores de menisco del tipo de característica de la superficie física que reducen la magnitud de un menisco formado dentro de un recipiente al interferir físicamente con la formación del menisco. Ejemplos de un miembro reductor de menisco de este tipo incluyen una característica de la superficie que se introduce en la superficie de la pared interior de un recipiente o pocillo que contiene líquido para interferir físicamente con la formación del menisco. Ejemplos de dichas características superficiales se explican con mayor detalle en el presente documento.

Los inventores han descubierto ventajosamente que ambos aspectos descritos en el presente documento pueden usarse en combinación entre sí. Preferiblemente, un recipiente puede estar provisto con un miembro reductor de menisco que incluye una combinación de características de control de menisco de tipo de revestimiento superficial tanto físico como químico para ayudar a proporcionar un ángulo de contacto de retroceso deseado. Esto puede ayudar a proporcionar un ángulo de contacto de retroceso deseado entre el recipiente y una variedad de soluciones diferentes, cada una con propiedades químicas y/o físicas diferentes. Esto puede permitir que se use el mismo recipiente en combinación con una variedad de soluciones diferentes mientras que todavía proporciona un ángulo de menisco reductor que está dentro del rango deseado, y preferiblemente cercano a los 90 grados. Esto puede ayudar a reducir la cantidad de recipientes diferentes que necesita un usuario para acomodar diferentes líquidos y puede ayudar a reducir los costes de prueba.

En esta configuración, al menos un ángulo de contacto (por ejemplo, el ángulo intrínseco o el ángulo de retroceso o ambos) formado entre una característica de la superficie física revestida químicamente está más cerca del valor deseado (por ejemplo, 90 grados) que el ángulo de contacto correspondiente formado entre el mismo líquido y i) una característica de la superficie física que no está revestida con el material de revestimiento, y ii) una porción de la pared del recipiente que está revestida con el material de revestimiento químico pero que por lo demás es lisa y no incluye unas características de la superficie como se describen en el presente documento.

El miembro reductor de menisco que tiene la combinación de características de la superficie física de la piel y un material de revestimiento químico está configurado para ayudar a proporcionar un ángulo de interfase entre la superficie del líquido donde contacta con el miembro reductor de menisco y un plano generalmente vertical que se encuentra entre aproximadamente 75 grados a aproximadamente 110 grados, aproximadamente 80 grados a aproximadamente 110 grados, aproximadamente 85 grados a aproximadamente 105 grados y preferiblemente de aproximadamente 90 grados (es decir, un menisco generalmente plano) con soluciones acuosas y medios de cultivo. En algunos ejemplos, el ángulo de interfase puede ser el ángulo de contacto de retroceso entre las soluciones acuosas o los medios de cultivo y el miembro reductor de menisco. En otros ejemplos, el ángulo de interfase puede ser la suma de un ángulo de contacto de retroceso entre las soluciones acuosas o los medios de cultivo y una porción inclinada del miembro reductor de menisco, y el ángulo de inclinación de dicha porción inclinada (es decir, la suma del ángulo de una superficie en contacto y el ángulo de contacto entre el fluido y la superficie). Opcionalmente, el material de revestimiento puede seleccionarse para limitar la adhesión de constituyentes moleculares presentes en solución acuosa o medio de cultivo celular. Esto puede ayudar a prevenir la alteración de las propiedades de la superficie del revestimiento. Cuando se hace referencia a la interfase entre un líquido y una superficie generalmente vertical, los términos ángulo de interfase y ángulo de contacto pueden usarse indistintamente para los propósitos de esta descripción.

Haciendo referencia a la figura 3, un recipiente 100 puede estar provisto con un miembro 132 reductor de menisco. En el ejemplo ilustrado, el miembro 132 reductor de menisco incluye una característica 134 de la superficie física que se superpone a al menos una porción de una superficie 105 interior del recipiente 100.

La característica 134 de la superficie física incluye preferiblemente al menos dos superficies 136, 137 diferentes que están separadas lateralmente una de la otra y pueden configurarse para contactar con el líquido 102 en el recipiente 100. Las al menos dos superficies 136, 137 cooperan para reducir una magnitud de un menisco 120 y un ancho 121 del menisco (mostrado en las figuras 1a y 1c) formado en una interfase entre el líquido 102 y la característica 134 de la superficie física alterando físicamente o compensando el ángulo 116 de contacto entre el líquido 102 y la característica 134 de la superficie física.

Haciendo referencia a la figura 3, en el ejemplo ilustrado, la característica 134 de la superficie física es una característica de tipo escalón en la que las al menos dos superficies 136, 137 incluyen la primera y la segunda superficies 138, 140 y una cara 142 de escalón generalmente orientada hacia arriba que se extiende entre las mismas (en esta solicitud, "hacia arriba", "superior" y otros términos similares se utilizan generalmente para referirse a la dirección hacia el extremo superior abierto del recipiente 110). Opcionalmente, como se explica con mayor detalle a continuación, las caras 138 y 140 pueden ser porciones de la cara 105 interior del recipiente que están colocadas alrededor del nivel de llenado esperado del líquido en el recipiente 100, o pueden estar provistas en un miembro separado, como un inserto. En el ejemplo ilustrado, la cara 142 de escalón se extiende entre las caras primera 138 y segunda 140 y las conecta. Se define una esquina 143 de escalón entre el borde lateralmente exterior de la cara 142

de escalón y la primera cara 138 y se define un borde 144 de escalón por la intersección de la segunda cara 140 y la cara 142 de escalón.

En este ejemplo, si el líquido 102 está a un nivel tal que está por encima de la cara 142 de escalón y se acopla directamente a la primera superficie 138 interior, el ángulo 117 de interfase es el ángulo 116 de contacto de retroceso entre el líquido y un plano 119 que contiene la primera superficie 138 interior (un plano generalmente vertical en el ejemplo ilustrado). Como alternativa, si el líquido 102 está a un nivel tal que la superficie del líquido 102 se acopla con el borde 144 de escalón (es decir, no contacta realmente con la primera superficie 138 interior), el ángulo 117 de interfase todavía se puede medir con respecto al plano 119 a pesar del hecho que el líquido 102 no "contacta" realmente con la primera superficie 138 interior.

10 Opcionalmente, como se muestra en las figuras 3 y 5, la cara 142 de escalón puede ser una superficie orientada hacia arriba generalmente plana que es generalmente horizontal y generalmente perpendicular a la primera y segunda caras 138, 140 interiores.

En esta configuración, se ha observado que si el nivel de líquido está por debajo de la cara 142 de escalón, se produce un menisco generalmente cóncavo y que si el nivel de líquido está en o por encima de la cara 142 de escalón (es decir, la superficie del líquido se acopla con la cara 142 de escalón), entonces el menisco es generalmente más plano. En los ejemplos ilustrados (que incluyen otros modos de realización descritos en el presente documento) puede ser ventajoso situar los miembros reductores de menisco (y/o controlar la cantidad de líquido dentro del recipiente) de modo que la superficie del líquido se acople a la cara 142 de escalón (o cara 1142 como se describe en el presente documento, etc.) o se fije/inmovilice al nivel del borde 144 de escalón.

20 como alternativa, las figuras 4 y 6 ilustran otro ejemplo de un recipiente 1100 que incluye un miembro 1132 reductor de menisco. El recipiente 1100 puede ser generalmente similar al recipiente 100, y las características análogas se identifican usando números de referencia análogos indexados por 1000. En las figuras 4 y 6, la cara 1142 de escalón es una superficie angulada o inclinada que forma un ángulo oblicuo con las caras primera 1138 y segunda 1140, de la superficie interior que tiene un ángulo 1148 de inclinación.

25 La formación de menisco dentro del recipiente puede limitarse (es decir, el ángulo 116 de contacto puede acercarse a 90 grados y la magnitud 120 del menisco puede acercarse a cero) mediante la introducción de la característica 1134 de la superficie física de un solo escalón o de tipo escalón en una posición determinada alrededor del perímetro interior de la superficie 1105 interior de la superficie del recipiente 1100. En los ejemplos ilustrados, las características 134 y 1134 de la superficie física de tipo escalón están ubicadas hacia los extremos 110 y 1100 superiores de los recipientes 100 y 1100. Como alternativa, las características 134 y 1134 de la superficie física pueden ubicarse en otras posiciones dentro de los recipientes 100 y 1100. Opcionalmente, las características de la superficie física pueden extenderse continuamente alrededor de todo el perímetro interior del recipiente en el que están ubicadas (como se ilustra). Como alternativa, las características de la superficie física pueden configurarse para extenderse solo parcialmente alrededor del interior del recipiente.

35 Cuando un líquido entra en contacto con la característica 134 de la superficie física de tipo escalón, como se muestra en las figuras 3 y 5, el menisco formado en la interfase entre la superficie 105 interior y el líquido disminuye a medida que el nivel de líquido en el recipiente se acerca al borde 144 de escalón de la característica 134 de la superficie física. Para formar un menisco entre el líquido 102 y el recipiente 100, el líquido 102 debe estar en contacto físico con la superficie 105 interior del recipiente 100 y la magnitud 120 de menisco (mostrado en las figuras 1a y 1c) no puede exceder la distancia entre la superficie libre del líquido 114 y el extremo superior del recipiente 110. La característica 134 de la superficie física de tipo escalón actúa como un borde superior virtual o de imitación del recipiente. A medida que aumenta el nivel de la superficie del líquido 102 dentro del recipiente 100, la distancia entre la superficie 114 del líquido, el borde 144 de escalón y la cara 142 de escalón disminuye, reduciendo de este modo la porción disponible de la segunda porción 140 interior que puede soportar el menisco. Cuando el nivel del líquido contenido en el recipiente es igual a la posición del borde 144 de escalón, se producirá una interfase plana líquido-vapor (es decir, un ángulo 117 de interfase de 90 grados), independientemente del ángulo 116 de contacto intrínseco de la interfase líquido-vapor-sólido (es decir, el ángulo 116 de contacto entre el líquido 102 y una superficie 122 plana hecha del material de la característica 134 de la superficie física). Si la cara 142 de escalón es horizontal, para lograr el ángulo 117 de interfase de 90 grados deseado, el nivel del líquido puede alinearse esencialmente con el borde 144 de escalón. Establecer el nivel de líquido para que esté alineado generalmente con el borde 144 de escalón puede ayudar a proporcionar un ángulo 117 de interfase.

La capacidad de reducción de menisco de la característica 134 de la superficie física de tipo escalón puede ser más efectiva cuando la superficie libre del líquido está generalmente nivelada con el borde 144 de escalón o alguna porción de la cara 142 de escalón inclinada. Si la superficie libre del líquido está nivelada con el borde 144 de escalón, entonces la línea 130 tangente (como se muestra en la figura 2) será paralela al borde 144 de escalón (es decir, generalmente 90 grados con respecto a la superficie 136 y el plano 119).

En el presente ejemplo, la primera y segunda caras 138, 140 interiores son generalmente ortogonales al plano 108 inferior (es decir, generalmente verticales cuando el recipiente está en posición vertical) y la segunda cara 140 interior está desplazada lateralmente hacia adentro desde la primera cara 138 interior por una distancia 141 de

desplazamiento (mostrada en la figura 3). La distancia 141 de desplazamiento puede ser superior a 0,1mm y en el presente ejemplo es de aproximadamente 0,75mm. Tanto la primera como la segunda caras 138, 140 interiores tienen una forma generalmente anular y están alineadas concéntricamente. Cuando se hace referencia a un plano que contiene la primera o la segunda superficies 138, 140 interiores se entiende que es un plano que es tangencial a la respectiva superficie 138, 140 en el lugar de la medición.

Haciendo referencia a la figura 4, cuando un líquido entra en contacto con la característica 1134 de la superficie física del recipiente 1100, como se muestra en las figuras 4 y 6, la magnitud 120 del menisco (figura 1a) puede reducirse debido a la compensación del ángulo 116 de contacto intrínseco de la línea de contacto trifásica por la pendiente de la cara 1142 de escalón, representada por el ángulo 1148. Esto puede ayudar a modificar el ángulo de interfase hacia 90 grados, pero puede ser menos efectivo que la combinación de la esquina 144 aguda y la cara 142 horizontal como se muestra en las figuras 3 y 5. Sin embargo, proporcionar una cara 1142 en ángulo puede aumentar la altura 1135 (figura 6) de la característica 1134 de la superficie física. El aumento de la altura de la característica 1134 de la superficie puede aumentar los niveles de alcance del líquido dentro del recipiente en el que la superficie 114 del líquido hace contacto con la cara 1142. Es decir, para contactar con la característica 1134 de la superficie física 1134 la superficie 114 del líquido no necesita estar exactamente alineada con el borde 1144, pero puede situarse en cualquier lugar donde esté en contacto con la superficie 1142, por ejemplo, verticalmente entre el borde 1144 y la esquina 1143. Esto puede permitir un mayor grado de flexibilidad para los usuarios ya que no necesitan hacer coincidir el nivel de líquido exactamente con la altura del borde interior 1144 cuando se llena el recipiente 1100.

En el ejemplo ilustrado, cuando el líquido 102 está a un nivel tal que entra en contacto con la primera superficie 1138 interior, el ángulo 117 de interfase es el ángulo 116 de contacto de retroceso entre el líquido y la primera superficie 1138 interior (muy similar al ejemplo de las figuras 3 y 5). Como alternativa, si el líquido 102 está a un nivel que entra en contacto con la superficie 1142 inclinada, el ángulo 117 de interfase es la suma del ángulo de contacto entre el líquido y la superficie 1142 y el ángulo 1148 de la superficie (un ángulo de inclinación) relativo al plano 1119 de referencia (véanse las figuras 4 y 6).

El ángulo 1148 de inclinación puede estar entre 0 y aproximadamente 90 grados, entre aproximadamente 45 y aproximadamente 15 grados, y en el ejemplo ilustrado el ángulo 1148 de inclinación es de aproximadamente 45 grados. En esta configuración, el menisco puede ser generalmente plano (es decir, el ángulo 117 de interfase puede ser de aproximadamente 90 grados) cuando la suma del ángulo 1148 de inclinación y el ángulo de contacto entre el líquido y la cara 1142 angulada es de aproximadamente 90 grados.

Los efectos de las topologías de superficie de los insertos sobre la magnitud del menisco se resumen en la Tabla 1. El uso de un inserto sin características dio como resultado una reducción significativa del ancho 121 del menisco (como se muestra en las figuras 1a y 1c) a aproximadamente el 50% en comparación con la superficie de los pocillos de cultivo de poliestireno sin tratar. De las características 134 de la superficie de tipo escalón, la cara 142 plana de escalón, como se muestra en las figuras 3 y 5, produjo una reducción del 40% de la magnitud del menisco en relación con el control del inserto sin características, y la configuración de la cara 1142 de escalón inclinada, como se muestra en las figuras 4 y 6, eliminó el menisco observable (es decir, no se creó ningún menisco observable usando la cara 1142 de escalón inclinada).

Cuando se aumentó el nivel del líquido por encima de los bordes 144, 1144 de escalón de las características 134, 1134, de la superficie se observó una interfase líquido/sólido distinta y un fondo de intensidad uniforme debido a la naturaleza opaca de los insertos de plástico.

Tabla 1: Efecto de los insertos sobre la magnitud del menisco, con el nivel de líquido en el borde inferior de los insertos.

inserto	Ancho del Menisco (mm)
No tratado, sin inserto	2,2
Inserto sin características	1,2
Inserto de escalón plano	0,7
Inserto de escalón inclinado	0,0

Los miembros 132 y 1132 reductores de menisco también incluyen un miembro reductor de menisco del tipo de revestimiento o tratamiento químico. Por ejemplo, se puede aplicar un compuesto reductor de menisco del tipo de revestimiento o tratamiento químico a algunas o todas las características 134 y 1134 de la superficie física para ayudar a modificar aún más el ángulo de contacto, y preferiblemente para proporcionar un ángulo de contacto de retroceso deseado. De acuerdo con la invención, el revestimiento se aplica a las caras 1138, 138 y las caras 142, 1142.

Opcionalmente, el tratamiento de superficie y/o revestimiento se puede aplicar a las caras 138, 140 y la superficie 142 (y de manera similar las caras 1138, 1140 y superficie 1142). Como alternativa, el tratamiento de superficie y/o material de revestimiento solo se puede proporcionar en al menos una de las caras 138, 140 y 142 (y caras similares 1138, 1140 y 1142). Por ejemplo, la aplicación de material de revestimiento puede limitarse a la cara 142 (1142) de escalón y/o la superficie 142 (1142) y al menos una de las caras 138, 140 (1138, 1140) primera y segunda.

Proporcionar un tratamiento químico y/o material de revestimiento de superficie en la característica 1134 de la superficie, incluida la cara 1142 de escalón angulada, puede ayudar a reducir aún más el menisco formado entre la cara 1142 de escalón y el líquido. La combinación de la reducción física del menisco y la reducción de menisco del tipo químico/revestimiento de superficie puede ayudar a que la configuración de la cara 1142 de escalón angulada proporcione el ángulo de contacto de retroceso deseado, mientras que conserva la flexibilidad con respecto al nivel de llenado del líquido dentro del recipiente 1100.

El efecto del material de revestimiento de superficie se puede medir comparando un ángulo de contacto sin revestimiento con un ángulo de contacto revestido. Para los propósitos de esta solicitud, un ángulo de contacto sin revestimiento es el ángulo de contacto formado entre una superficie, por ejemplo, la característica 134, 1134 de la superficie física y un líquido determinado en ausencia de un material de revestimiento. Puede ser posible determinar un ángulo de contacto intrínseco sin revestimiento y ángulos de contacto de avance y retroceso sin revestimiento, como se describe en el presente documento. Por el contrario, ha de entenderse que el ángulo de contacto revestido es el ángulo de contacto formado entre la misma superficie y el mismo líquido después de que la superficie ha sido revestida con el material de revestimiento. Puede ser posible determinar ángulos de contacto intrínsecos, de avance y retroceso revestidos.

La combinación de la superficie, por ejemplo, la característica 134, 1134 de la superficie física y el material de revestimiento que se seleccionará de modo que el miembro reductor de menisco proporcione un ángulo de contacto intrínseco revestido y un ángulo de contacto de retroceso revestido cuando entra en contacto con el líquido, y el ángulo de contacto de retroceso revestido está entre aproximadamente 75 grados y aproximadamente 110 grados y está más cerca de 90 grados que el ángulo de contacto intrínseco revestido.

El material de revestimiento se puede aplicar a la segunda superficie 138 interior de la pared del recipiente mediante cualquier método adecuado. Ejemplos de métodos de aplicación adecuados incluyen:

- Aplicación o inserción de materiales preformados (con o sin adhesivo);
- Aplicación del material utilizando un aplicador físico seguido de la eliminación del material sobrante;
- Aplicación por inmersión del recipiente en el material de revestimiento o una solución del mismo, seguido de secado;
- Aplicación de un material fundido seguido de enfriamiento y solidificación;
- Disolución del material de revestimiento en un disolvente adecuado y aplicación de esta solución, seguida de la eliminación del disolvente por evaporación, aspiración y/o lavado;
- Aplicación de un material que cura al exponerse al aire, el calor o la luz, como la luz ultravioleta; y
- Aplicación de un agente después de la adición del material que hace que el material se cure.

Como alternativa, la segunda superficie 138, 1138 interior del recipiente de cultivo podría estar hecha de los materiales de revestimiento si el material que se usa es suficientemente rígido.

Se puede usar cualquier aplicador físico adecuado para aplicar al material de revestimiento, incluyendo, por ejemplo, un material sin pelusa, como un pañuelo sin pelusa, que se puede usar solo o unido a un dispositivo aplicador adecuado.

Después de que se aplica el material de revestimiento, se puede dejar que se asiente durante un período de tiempo suficiente, se puede eliminar el exceso si es necesario (por ejemplo, utilizando un aplicador físico limpio) y se puede dejar curar el material, por ejemplo, incubándolo durante un tiempo y temperatura adecuados. Un experto en la técnica podrá determinar las condiciones de curado basándose en el tipo de recipiente y la identidad del material de revestimiento. Por ejemplo, los recipientes de poliestireno se pueden incubar a una temperatura de aproximadamente 50°C a 80°C, mientras que los recipientes de PTFE se pueden incubar a temperaturas más altas, por ejemplo, aproximadamente 150°C a aproximadamente 250°C. Los recipientes se enfrían a temperatura ambiente antes de su uso.

El tiempo entre la aplicación del material de revestimiento y el uso del recipiente dependerá del método de aplicación. Los recipientes preparados con materiales preformados se pueden utilizar inmediatamente. Los recipientes preparados con materiales que requieren la eliminación de un disolvente o el curado requerirán desde unos pocos minutos hasta varios días dependiendo del material, el método de aplicación y las condiciones atmosféricas, como sería conocido por un experto en la técnica.

- Un material de revestimiento preferido es cualquier material que pueda hacerse para adherirse a las características 134, 1134 de la superficie física (como una porción integral de un recipiente y/o como un inserto separado) para dar como resultado un ángulo de contacto mínimo dinámico (retroceso) de aproximadamente 90 grados (o dentro de cualquiera de los intervalos enumerados en el presente documento) con soluciones acuosas y medios de cultivo comunes. Los materiales de revestimiento potenciales incluyen, sin limitación, uno o más de los siguientes, o cualquier combinación adecuada de los mismos:
- 5 • agentes siliconizantes líquidos como soluciones de metilsiloxanos, metilvinilsiloxanos y metil-perfluorobutiletil-siloxanos y sus copolímeros;
  - 10 • metil perfluorobutiletil siloxano, metilhidrógeno siloxano, dimetil siloxano y metil vinil siloxano, metil (perfluorobutiletil) siloxano terminado en trimetilsiloxi y metilhidrógeno siloxano terminado en trimetilsiloxi.
  - agentes fluoropolímeros, incluyendo soluciones de fluoropolímeros en fluorosolventes de bajo punto de ebullición;
  - ceras de parafina;
  - ceras de poliolefina;
  - ceras de animales e insectos, incluyendo cera de abejas, goma laca, espermaceti, lanolina;
  - 15 • ceras vegetales, incluyendo arrayán, candelilla, carnauba, ricino, esparto, Japón, aceite de jojoba, ouricuri y salvado de arroz;
  - ceras minerales, incluyendo ceresina, montana, ozocerita y turba;
  - ácidos grasos saturados de tipo cera, incluyendo ácidos láurico, mirfístico, palmítico, margárico, esteárico, araquídico, behénico, tetracosánico, lignocérico, cerótico y melísico;
  - 20 • ácidos grasos saturados de tipo no cera, incluyendo ácido butírico, caproico, caprílico y cáprico;
  - ácidos grasos insaturados de tipo cera, incluyendo ácidos tiglico, hipogéico, gaídico, fisetoleico, elaídico, isooleico, erúdicico, brasídico e isoerúdicico;
  - ácidos grasos insaturados de tipo no cera, incluyendo ácidos oleico, linoleico, alfa-linoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico y erúdicico;
  - 25 • alcoholes grasos de tipo cera, incluyendo 1-tetradecanol, 1-pentadecanol, 1-hexadecanol, 1-heptadecanol, 1-octadecanol, 1-nonadecanol, 1-eicosanol, 1-heneicosanol, 1-docosanol, 1-tricosanol, 1-tetracosanol, 1-pentacosanol, 1-hexacosanol, 1-heptacosanol, 1-octasanol, 1-nonacosanol, 1-tricontanol, 1-hentriacontanol, 1-dotriacontanol, 1-tritriacontanol y 1-tetracontanol;
  - alcoholes grasos de tipo no cera, incluyendo 1-hexanol, 1-heptanol, 1-octanol, 1-nonanol, 1-decanol, 1-undecanol, 1-dodecanol y 1-tridecanol;
  - 30 • materiales sólidos, incluyendo materiales que comprenden copolímeros de hexafluoropropileno (HFP) y fluoruro de vinilideno (VDF o VF2), terpolímeros de pertetrafluoroetileno (PTFE) o tetrafluoroetileno (TFE), fluoruro de vinilideno (VDF) y hexafluoropropileno (HFP) y hexafluoropropileno (HFP), perfluorometilviniléter (PMVE), silicio (disponible comercialmente como Viton<sup>MR</sup> de Dupont Performance Elastomers); Nitrilo de Buna (también llamado nitrilo de grado estándar), fluorosilicio, neopreno, uretano, HSN (nitrilo altamente saturado), cauchos de silicona y monómero de etileno propileno dieno (EPDM); y
  - 35 • revestimientos de polímeros de poliperfluoroalquilo y perfluoropoliéter, de fluorouretano, perfluoropoliéter y perfluoroalquil fluorosilanos
  - revestimientos en suspensión de partículas superhidrófobas como FluoroPel y PFC M1104V de Cytonix (Beltsville, MD), o revestimientos superhidrófobos a base de varillas o cepillos.
  - 40
- Revestimientos adecuados también pueden incluir varios ésteres de los ácidos grasos enumerados anteriormente con cualquier alcoholes grasos adecuados o esteroides como colesterol y/o gliceroides.
- Los inventores han descubierto que un ejemplo de un material de revestimiento es la solución Dehesive® basada en silicona fabricada por Wacker que los inventores creen que contiene aproximadamente al menos 63% en peso de uno o más de metil perfluorobutiletil siloxano, metilhidrógeno siloxano, dimetil siloxano y metil vinil siloxano en solución que se reticula con una solución de reticulación que comprende al menos aproximadamente 60% en peso de uno o más de metil (perfluorobutiletil) siloxano terminado en trimetilsiloxi y metilhidrógeno siloxano terminado en trimetilsiloxi.
- Opcionalmente, el material de revestimiento puede ser a base de silicona, a base de fluoropolímero, vaselina, cera de parafina, EPDM o Nitrilo de Buna o es un inserto que está hecho de silicona, EPDM o Nitrilo de Buna o que está revestido con un material de revestimiento que es a base de silicona, a base de fluoropolímero, vaselina, cera de
- 50

parafina, EPDM o Nitrilo de Buna. Opcionalmente, el material a base de silicona puede incluir siloxano, metilsiloxano o metilvinil siloxano no reticulados o copolímeros de los mismos.

Los miembros 132, 1132 de reducción de menisco y los recipientes y/o insertos que contienen los miembros 132 y 1132 pueden ser especialmente útiles cuando el recipiente se usa para contener geles o soluciones acuosas viscosas. Por viscoso se entiende que la solución tiene una viscosidad o resistencia al flujo que es mayor que la viscosidad del agua, o mayor que aproximadamente 1mPa·s, adecuada mayor que aproximadamente 5mPa·s, y hasta aproximadamente 4000mPAs. Opcionalmente, la solución acuosa viscosa puede ser cualquier solución comúnmente utilizada en cultivos celulares o ensayos basados en células, por ejemplo, tampones biológicos y cualquier medio que pueda soportar el crecimiento de las células, incluyendo, sin limitación, Medio de Águila Modificado de Iscove (IMDM), Medio de Águila Modificado de Dulbecco (DMEM), solución salina equilibrada de Hank, medios a base de metilcelulosa (como MethoCult<sup>MR</sup>), medios a base de agar, medios a base de gelatina y medios a base de colágeno. Como alternativa, la solución acuosa viscosa puede ser una solución que comprenda biopolímeros, como proteínas, glicoproteínas, péptidos, polisacáridos y/u oligonucleótidos y/o polímeros solubles en agua como glicoles de polialquileno. En otro modo de realización más de la solicitud, la solución es una que comprende moléculas que alteran las propiedades de la superficie de las paredes interiores de los recipientes, alterando de este modo el ángulo de contacto de las paredes cuando las paredes se humedecen con la solución.

Preferiblemente, los materiales de revestimiento se aplican a las características 134, 1134 de las superficies físicas de una manera y en una cantidad eficaz para reducir la curvatura en el menisco del medio de cultivo celular u otras soluciones acuosas comunes dando como resultado una energía superficial para permitir un ángulo de contacto de retroceso de aproximadamente 90 grados, adecuadamente de aproximadamente 75 grados a aproximadamente 110 grados, más adecuadamente de aproximadamente 80 grados a aproximadamente 110 grados, incluso más adecuadamente de aproximadamente 85 grados a aproximadamente 105 grados y aproximadamente 90 grados. El material de revestimiento concreto seleccionado, el grosor del revestimiento y otras propiedades del material de revestimiento pueden elegirse basándose en una variedad de factores, que incluyen, por ejemplo, la geometría de las características 134, 1134 de la superficie física.

Opcionalmente, como se ilustra en la figura 3 y 4, los miembros 132 y 1132 de reducción de menisco, incluyendo las características 134 y 1134 de la superficie física, pueden ser integrales con los recipientes 100 y 1100 y la primera y segunda porciones 138, 140 y 1138 y 1140 y las caras 142 y 1142 de escalón pueden ser integrales y formar una porción de las superficies 105 y 1105 interiores de las paredes 104 y 1104 laterales. Como alternativa, como se ilustra en las figuras 5 y 6, los miembros 132 y 1132 reductores pueden estar provistos como miembros 146 y 1146 de inserto separados, en este ejemplo, miembros 146 y 1146 de inserto anulares o en forma de anillo, que están dimensionados para encajar dentro de un recipiente complementario de modo que las características 132 y 1132 de la superficie se superponen a al menos una porción de la superficie interior del recipiente y entran en contacto con el líquido.

Los miembros 146 y 1146 de inserto pueden estar hechos de cualquier material adecuado como se describe en el presente documento, y no es necesario que sean del mismo material que el recipiente circundante. Por ejemplo, un miembro de inserto polimérico puede recibirse dentro de un tubo de ensayo, vaso de precipitados, vial u otro recipiente. Ha de entenderse que la forma y las dimensiones generales de los miembros 146 y 1146 de inserto pueden elegirse basándose en la forma y el tamaño de un recipiente concreto.

Opcionalmente, las características 134 y 1134 de la superficie física pueden extenderse generalmente de manera continua alrededor de todo el perímetro interior de las superficies 105 y 1105 interiores de sus respectivos recipientes 100, 1100. Como alternativa, las características 134 y 1134 de la superficie física pueden extenderse solo parcialmente alrededor del perímetro interior de las superficies 105 y 1105 interiores. Si bien las caras 142 y 1142 de escalón se ilustran como esencialmente planas, opcionalmente las caras 142 y 1142 de escalón pueden ser superficies curvas o no planas.

Los materiales adecuados para construir las características 134 y 1134 de la superficie física de tipo escalón, ya sea como un inserto 146, 1146 o una porción integral de los recipientes 100, 1100, pueden ser cualquiera de los materiales utilizados para formar los recipientes 100, 1100, incluyendo, por ejemplo, poliestireno, polipropileno, policarbonato, cloruro de polivinilo, politetrafluoroetileno (PTFE), silicona, EPDM (monómero de etileno propileno-dieno), Nitrilo de Buna y plástico de peso molecular ultra alto (UHMW).

Los recipientes 100, 1100 y otros que utilizan los miembros 132, 1132 reductores de menisco descritos en el presente documento pueden usarse para una variedad de propósitos, incluyendo el cultivo de células o la realización de ensayos basados en imágenes. Los ensayos basados en imágenes pueden ser cualquiera de dichos ensayos utilizados tanto en la técnica biológica como en la química, por ejemplo, ensayos de células formadoras de colonias (CFC), secuenciación de genes, química combinatoria, descubrimiento de fármacos y proteómica.

Opcionalmente, la obtención de imágenes de células o ensayo basado en imágenes de un líquido que está en contacto con un miembro reductor de menisco adecuado puede realizarse usando luz visible, luz ultravioleta, luz infrarroja y/o fluorescencia, en concreto luz visible. La formación de imágenes con luz visible se puede realizar, por ejemplo, utilizando el modo de campo oscuro, el modo de campo claro, el concurso de fases o el contraste de interferencia

digital. Opcionalmente, la formación de imágenes se puede realizar de forma manual o automática y/o las células de las que se obtienen imágenes pueden estar en una colonia de células.

Los materiales de revestimiento de superficie se pueden aplicar a las superficies interiores del recipiente y/o característica de la superficie física usando una variedad de técnicas adecuadas. De acuerdo con un primer método para revestir insertos separados (por ejemplo, como se ilustra en las figuras 5 y 6) para ser insertados en recipientes, un revestimiento de un polímero de siloxano (Syl-off<sup>MR</sup> Q2-7785 (monómero), Syl-off MR Q2-7560 (reticulante), Dow Corning) diluido en un disolvente se aplicó a los insertos. El disolvente puede ser cualquier disolvente adecuado que sea compatible con el material de revestimiento seleccionado y proporcione la viscosidad deseada para el proceso de revestimiento, incluyendo, por ejemplo, hexano y otros disolventes orgánicos o basados en hidrocarburos.

En este método, los insertos se sumergen en un contenedor de la solución de revestimiento para cubrir completamente el inserto y se colocan sobre una superficie para permitir que fluya el exceso de revestimiento. Se puede dejar que los insertos se escurran durante cualquier período de tiempo adecuado para permitir que fluya una cantidad suficiente del revestimiento fuera del inserto, incluyendo, por ejemplo, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30 minutos, o más. A continuación, los insertos se colocan en los pocillos de una placa de 6 pocillos y se curan. El proceso de curado se puede realizar bajo cualquier condición que sea apropiada para curar el material de revestimiento seleccionado. Por ejemplo, los insertos se pueden curar a una temperatura elevada de entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 100°C, y se pueden curar a aproximadamente 70°C. El tiempo de curado puede ser cualquier tiempo adecuado y puede estar entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 12 horas, y en algunas configuraciones puede ser de al menos 2 horas. A continuación, se pueden colocar insertos revestidos con un revestimiento de superficie curado dentro de recipientes adecuados y exponerlos a los líquidos que contienen.

De acuerdo con un segundo método para revestir los insertos, se apilan varios insertos de extremo a extremo en un tubo con un diámetro ligeramente mayor que los insertos y luego se giran alrededor del eje del tubo minutos mientras una cantidad deseada de solución de revestimiento se añade, por ejemplo, al tubo. Opcionalmente, la cantidad de solución de revestimiento añadida al tubo puede estar entre aproximadamente 250uL y aproximadamente 500uL de solución por inserto, y preferiblemente es aproximadamente 330uL de solución por inserto.

A medida que se gira el tubo, la solución puede revestir las paredes de cada inserto. El tubo puede dimensionarse para contener cualquier número deseado de insertos y, opcionalmente, puede dimensionarse para contener aproximadamente 15 insertos. La solución de revestimiento puede mantenerse dentro del tubo durante el giro tapando los extremos del tubo. El tubo se puede girar a cualquier velocidad adecuada que permita que el material de revestimiento cubra los insertos del mismo. Opcionalmente, el tubo se puede girar entre aproximadamente 1rpm y aproximadamente 25rpm o más, y preferiblemente se puede girar a aproximadamente 8rpm. El tubo se puede girar durante cualquier período de tiempo adecuado y preferiblemente se hace girar hasta que se haya evaporado al menos parte del disolvente mezclado con la solución de revestimiento. Opcionalmente, el tubo se puede girar durante aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos o más, y opcionalmente se puede girar durante aproximadamente 20 minutos para permitir que se evapore el hexano. Los insertos revestidos pueden entonces colocarse en los pocillos de una placa de 6 pocillos de uno en uno. A continuación, toda la placa se cura a 70°C durante al menos 2 horas, o en cualquier otra condición de curado adecuada como se describe en el presente documento.

El disolvente, por ejemplo, hexano, se usa para reducir la viscosidad del material de revestimiento (por ejemplo, siloxano) de modo que fluya hacia abajo por la pared del inserto a medida que gira dentro del tubo. Un material de revestimiento con menor viscosidad puede fluir suficientemente por sí solo y puede que no requiera un disolvente adicional.

De acuerdo con otro método de revestimiento de un inserto, se generó un inserto que incluye una cara 142 de escalón generalmente horizontal que rodea la circunferencia interior de un pocillo adecuado de 35mm mediante la colocación de un inserto en el interior del pocillo. El inserto puede estar hecho de cualquier material adecuado, incluyendo, por ejemplo, una junta de nitrilo que da un ancho de cara 142 de escalón de 1mm y una distancia entre la cara 142 de escalón y el fondo 106 del pocillo de 1mm, y fabricado a partir de una tira de lámina de PTFE que da un ancho de cara 142 de escalón de aproximadamente 1mm y una distancia entre la cara 142 de escalón y el fondo 106 del pocillo de 0,5mm. Los insertos se pueden colocar al ras contra el fondo de pocillo de los pocillos en una placa de pocillos adecuada, como una placa de 6 pocillos Greiner 607102. La superficie de la pared interior del pocillo por encima de la característica de escalón, por ejemplo, las superficies 138, 1138 descritas anteriormente, se puede revestir entonces con cualquier material de revestimiento adecuado. Preferiblemente, el material de revestimiento es un material hidrófobo o superhidrófobo.

Por ejemplo, un material de revestimiento superhidrófobo, como, por ejemplo, WX2100 (Cytonix LLC, MD), se puede pulverizar sobre la superficie interior de un anillo de poliestireno con una altura de aproximadamente 10mm y un grosor de aproximadamente 0,5mm (diámetro exterior~35mm). El revestimiento se puede dejar secar durante cualquier tiempo adecuado (por ejemplo, aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente) antes de colocarlo en pocillos de 35mm que contienen la junta de nitrilo descrita anteriormente. Este conjunto proporciona una superficie de pared superhidrófoba (por ejemplo, 138, 1138) por encima de un escalón de 0,5mm (por ejemplo, la junta de nitrilo expuesta).

5 Como alternativa, se puede proporcionar una superficie superpuesta hidrófoba cuando se colocan pocillos de 35mm con los insertos de PTFE en una plataforma giratoria orientada de aproximadamente 1° a aproximadamente 5° desde la vertical de modo que el plano del fondo del pocillo sea perpendicular al eje de giro. Se puede aplicar una solución de revestimiento, como una solución de siloxano al 10% (Dehesive 920 y reticulante V90 de Wacker) (por ejemplo, aproximadamente 250uL por pocillo) a la pared lateral interior mientras se hacen girar los pocillos a una velocidad adecuada (por ejemplo, entre aproximadamente 1rpm y aproximadamente 25rpm y, opcionalmente, aproximadamente 8rpm). Preferiblemente, se evita que la solución de siloxano se desborde del inserto y entre en contacto con el fondo del pocillo.

10 Los pocillos se pueden girar durante cualquier período de tiempo adecuado para permitir que se evapore una cantidad suficiente del disolvente en la solución de revestimiento. Por ejemplo, el giro se puede continuar durante aproximadamente 5 minutos o más para evaporar la mayor parte o todo el disolvente. A continuación, el revestimiento se puede curar usando cualquier proceso de curado adecuado, incluyendo los descritos en el presente documento.

15 En los ejemplos en los que la característica de la superficie física está formada integralmente con el recipiente (por ejemplo, como se ilustra en las figuras 3 y 4), el material de revestimiento se puede aplicar directamente a las superficies interiores de los recipientes. De acuerdo con un método, se puede formar una placa de pocillos de modo que cada pocillo tenga una superficie interior escalonada (véanse las figuras 3 o 4). Opcionalmente, los pocillos pueden incluir una cara vertical (primera superficie 137) que tiene aproximadamente 1,25mm de alto y una cara 142 horizontal escalonada que tiene aproximadamente 0,75mm de ancho y sigue la circunferencia interior de cada fondo de pocillo.

20 Las placas se pueden revestir por encima de la cara 142 de escalón con cualquier material de revestimiento adecuado, incluyendo, por ejemplo, un revestimiento a base de siloxano hidrófobo (Dehesive<sup>MR</sup>, Wacker, Alemania) y un revestimiento a base de nanopartículas superhidrófobas (FluoroPel, Cytonix, EE.UU). El revestimiento a base de siloxano se puede preparar como una solución sin disolvente del monómero de siloxano, reticulante y catalizador. El revestimiento a base de nanopartículas se puede proporcionar a una concentración adecuada en un disolvente de perfluoropoliéter por el fabricante, y se utilizó tal como se suministró.

25 Los revestimientos se pueden aplicar mediante cualquier método adecuado. Opcionalmente, el revestimiento se puede aplicar de acuerdo con uno de los dos métodos descritos a continuación, o con cualquier otro método adecuado. Ambos métodos descritos en el presente documento están destinados a ayudar a reducir la posibilidad de que el material de revestimiento entre en contacto con el fondo de los pocillos. En ambos métodos, el revestimiento se puede aplicar a una placa con el fondo de la placa orientado desde la vertical hasta aproximadamente 5° desde la vertical y con la placa girando en el plano del fondo de la placa. Es preferible que el revestimiento no llegue al fondo de los pocillos, ya que un fondo de pocillo hidrófobo puede hacer que el fluido del pocillo se retraiga de la pared, provocando un menisco cóncavo fuerte y reduciendo el área total cubierta del fondo del pocillo. Esto, a su vez, puede resultar en interferencias ópticas para obtener imágenes del pocillo.

35 De acuerdo con un método de aplicación de revestimiento, el material de revestimiento (por ejemplo, un revestimiento a base de siloxano) se puede diluir en hexano a una concentración adecuada para reducir la viscosidad para facilitar la dispersión sobre la superficie de la pared del pocillo. El material de revestimiento se aplica a la pared de cada pocillo mientras gira a una velocidad de aproximadamente 8rpm (o cualquier velocidad adecuada entre aproximadamente 1rpm y aproximadamente 25rpm o más). Se puede aplicar un volumen adecuado (por ejemplo, aproximadamente 200uL) de material de revestimiento a cada pocillo durante un período de tiempo adecuado, incluyendo, por ejemplo, un período de entre aproximadamente 1/4 y aproximadamente 3/4 de giro del pocillo. El material de revestimiento se añade preferiblemente al punto más bajo de la pared del pocillo horizontal (por ejemplo, la cara 142 de escalón) a medida que gira. La viscosidad del revestimiento y la velocidad de giro pueden seleccionarse de modo que el volumen de material de revestimiento fluya hacia abajo y se disperse uniformemente sobre la superficie 142 a medida que se hace girar. Este método puede permitir la evaporación del disolvente y puede ayudar a proporcionar un revestimiento uniforme alrededor de la circunferencia de la primera superficie 138, 1138 por encima del escalón 142, 1142 mientras ayuda a limitar la migración del material de revestimiento a la segunda superficie 140, 1140 debajo de la cara 142 de escalón. Las placas se pueden dejar girar durante un período de tiempo adecuado, como, por ejemplo, alrededor de 5-30 minutos, para ayudar a eliminar el disolvente residual por evaporación. A continuación, las placas se pueden transferir a un horno para curar en condiciones adecuadas, como a aproximadamente 70°C durante al menos 2 horas para que se curen, para proporcionar una película sólida hidrófoba o superhidrófoba por encima de la superficie 142 de escalón con poco o ningún material de revestimiento debajo de la superficie 142 de escalón.

50 De acuerdo con otra aplicación de revestimiento, se aplica una formulación sin disolvente de un material de revestimiento adecuado (como solución de siloxano/reticulante/catalizador) directamente a la pared del recipiente mediante la dispensación a través de cualquier aparato adecuado, incluyendo, por ejemplo, una punta de pipeta conectada a la bomba peristáltica con tubo flexible. Como en el método anterior, la placa se puede mantener en una orientación de modo que el plano del fondo de la placa (por ejemplo, plano 108, 1108) sea aproximadamente vertical (por ejemplo, dentro de aproximadamente 0-5 grados de vertical), y luego girar alrededor de un eje perpendicular al fondo de la placa. La punta de pipeta se puede alinear para dispensar el revestimiento en el punto más bajo de la pared del pocillo y desplazarse unos 2mm desde la cara (142) de escalón horizontal. La dispensación de la solución de revestimiento se puede realizar mientras el pocillo gira alrededor de su eje de giro.

Mientras se aplica la solución de revestimiento, la placa se puede alejar simultáneamente de la punta de modo que se aplique una capa helicoidal continua de solución de revestimiento con un paso adecuado (preferiblemente un paso de entre aproximadamente 1,5 a 2mm) a la pared del recipiente. El pocillo se puede girar un número adecuado de veces durante este proceso, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 veces, y preferiblemente aproximadamente 4 veces, para depositar entre 12 y 60uL (preferiblemente entre 20 y 25uL) de material de revestimiento en las paredes del recipiente antes de que se detenga la dispensación de la solución de revestimiento. A continuación, la placa se puede colocar en una orientación generalmente horizontal y se puede dejar que el material de revestimiento se asiente durante un período de tiempo deseado, por ejemplo hasta aproximadamente 2 horas o más. Durante el período de asentamiento, la capa helicoidal de solución de revestimiento puede dispersarse en una película continua sobre la pared del pocillo. La película de revestimiento puede variar en grosor y puede ser más gruesa en la dirección del fondo del pocillo, con algo de material de revestimiento acumulándose en la cara (142) de escalón. Después del asentamiento, el revestimiento se puede curar como se describe en el presente documento.

Ejemplo 1: Medición del menisco en imágenes de campo claro

Se adquirieron imágenes de campo claro de aproximadamente 1mL de fluido en placas de 6 pocillos usando STEMvision<sup>MR</sup> (Stemcell Technologies Inc, Canadá) siguiendo el procedimiento de adquisición de imágenes recomendado. Este procedimiento incluye una etapa para estandarización de la intensidad de la iluminación y la posición focal. El área oscura debajo del menisco se midió utilizando métodos de procesamiento de imágenes digitales. El % de menisco se calculó luego como el área oscura debajo del menisco dividida por el área total del fondo del pocillo (excluyendo la cara de escalón).

Ejemplo 2 - Revestimiento de un inserto cilíndrico

Se fabricó a medida un inserto para placas estándar de 6 pocillos de poliestireno. El inserto era aproximadamente cilíndrico con una altura de aproximadamente 1cm, un grosor de pared de aproximadamente 0,5mm y un diámetro exterior que coincidía con el diámetro interior de un pocillo en una placa estándar de 6 pocillos. Algunos de los insertos se fabricaron además con 3-5 postes separados de manera equidistante alrededor de un extremo del cilindro. Estos postes tenían aproximadamente 1mm de alto y servían para evitar que todo el reborde del inserto tocara el fondo del pocillo.

Se aplicó un revestimiento de un polímero de siloxano (Syl-off<sup>MR</sup> Q2-7785 (monómero), Syl-off<sup>MR</sup> Q2-7560 (reticulante), Dow Corning) a los insertos. Las soluciones de revestimiento que contienen el monómero de separación Syl-off (33%-99% p/p) y reticulante (1%-67% p/p) se prepararon y diluyeron en hexano hasta una viscosidad adecuada para el revestimiento uniforme de las superficies del inserto. Se utilizaron dos métodos para aplicar el revestimiento a los insertos. En el primer método, los insertos se sumergieron en un recipiente de la solución de revestimiento para cubrir completamente el inserto y luego se colocaron sobre una superficie para permitir que el exceso de revestimiento fluyera durante aproximadamente 5 a 30 minutos. A continuación, los insertos se colocaron en los pocillos de una placa de 6 pocillos y se curaron a 70°C durante al menos 2 horas. En el segundo método, los insertos se apilaron de extremo a extremo en un tubo con un diámetro ligeramente mayor que los insertos y luego se giraron alrededor del eje del tubo por minutos mientras se añadían al tubo aproximadamente 330uL de solución por inserto. A medida que el tubo giraba, la solución cubría las paredes de cada inserto. El tubo era lo suficientemente largo para contener unos 15 insertos. La solución se mantuvo dentro del tubo durante el giro tapando los extremos del tubo. El tubo giró a aproximadamente 8rpm durante 20 minutos para permitir que se evaporara el hexano. A continuación, se colocaron los insertos en los pocillos de una placa de 6 pocillos de uno en uno. A continuación, se curó toda la placa a 70°C durante al menos 2 horas. El hexano se usó para reducir la viscosidad del siloxano de modo que fluyera por la pared del inserto mientras giraba. Es posible que un siloxano con menor viscosidad no requiera un disolvente.

Los pocillos con insertos revestidos dieron una excelente reducción de menisco en el ensayo de cultivo celular de medios semisólidos de progenitores hematopoyéticos. Se añadió aproximadamente 1mL de Methocult<sup>MR</sup> (Stemcell Technologies, Canadá) a cada pocillo y se colocó la placa en una incubadora humidificada durante 7 días. A continuación, se tomaron imágenes de las placas y se analizaron como se describe en el Ejemplo 1. La figura 7 muestra el % de cobertura de menisco del pocillo para n=72 pocillos preparados siguiendo el segundo método de aplicación de revestimiento de este ejemplo. A modo de comparación, el % de menisco en una placa estándar de poliestireno de 6 pocillos sin tratar es del 29%.

Ejemplo 3 - Revestimiento de un inserto de escalón

En este ejemplo, se generó una característica de escalón que consiste en una cara 142 de escalón horizontal que rodea la circunferencia interior de un pocillo de 35mm mediante la colocación de un inserto en el interior del pocillo. Los insertos estaban hechos de una junta de nitrilo que da un ancho de la cara 142 de escalón de 1mm y una distancia entre la cara 142 de escalón y el fondo 106 del pocillo de 1mm, o fabricados a partir de una tira de lámina de PTFE que da un ancho de la cara 142 de escalón de aproximadamente 1mm y una distancia entre la cara 142 de escalón y el fondo 106 del pocillo de 0,5mm. Los insertos se colocaron al ras contra el fondo del pocillo de las placas de 6 pocillos Greiner 607102. La superficie de la pared interior por encima de la característica de escalón se revistió con un material hidrófobo o superhidrófobo.

Superficie superpuesta superhidrófoba: se pulverizó WX2100 (Cytonix LLC, MD) sobre la superficie interior de un anillo de poliestireno con una altura de 10mm y un grosor de 0,5mm (diámetro exterior~35mm). Se dejó secar el revestimiento durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente antes de colocarlo en pocillos de 35mm que contenían la junta de nitrilo descrita anteriormente. Este conjunto constituye una superficie de pared superhidrófoba por encima de un escalón de 0,5mm (junta de nitrilo expuesta).

Superficie superpuesta hidrófoba: se colocaron pocillos de 35mm con insertos de PTFE sobre una plataforma giratoria orientada aproximadamente de 1° a 5° desde la vertical de modo que el plano del fondo del pocillo fuera perpendicular al eje de giro. Se aplicó una solución de siloxano al 10% (Dehesive 920 y reticulante V90 de Wacker) (aproximadamente 250uL por pocillo) a la pared lateral interior mientras se giraba a 8RPM. No se permitió que la solución de siloxano rebosara el inserto y entrara en contacto con el fondo del pocillo. Se continuó el giro durante 5 minutos hasta la evaporación total del disolvente. A continuación, el revestimiento se curó a 70°C durante aproximadamente 2 horas.

Para evaluar la mitigación del menisco, se colocó en los pocillos tratados un volumen (aproximadamente 1mL) de MethoCult<sup>MR</sup> suficiente para dar como resultado un nivel de líquido uniforme con el borde de la característica de resalte horizontal. Los pocillos se giraron para dispersar los medios y desbordar la característica de escalón para entrar en contacto con la superficie tratada alrededor de todo el perímetro del pocillo. Los pocillos se colocaron en una incubadora humidificada durante 5 días. Se tomaron imágenes de las placas y se analizaron como se describe en el Ejemplo 1 antes y después de la incubación. Los resultados, resumidos en la tabla siguiente, demuestran un área de menisco insignificante resultante con el revestimiento tanto hidrófobo como superhidrófobo.

Período de incubación (días)	Magnitud del menisco (% del área del pocillo)	
	Hidrófobo	Superhidrófobo
0	1,1%	0,4%
5	07%	0,6%

#### Ejemplo 4 - Aplicación de revestimiento a placa escalonada

Se fabricó a medida de poliestireno una placa de 6 pocillos con escalones integrales en cada pocillo, como en la figura 3. El escalón tenía una cara vertical (primera superficie 137) que tenía 1,25mm de altura y una cara 142 de escalón horizontal que tenía 0,75mm de profundidad y seguía la circunferencia interior del fondo de cada pocillo.

A continuación, las placas se revistieron por encima de la cara de escalón con un revestimiento a base de siloxano hidrófobo (Dehesive<sup>MR</sup>, Wacker, Alemania) o un revestimiento a base de nanopartículas superhidrófobas (FluoroPel, Cytonix, EE. UU.). El revestimiento a base de siloxano se preparó como una solución sin disolvente del monómero de siloxano (90-99% p/p), reticulante (0,5%-10% p/p) y catalizador (1%-4% p/p). El fabricante proporcionó el revestimiento a base de nanopartículas en una concentración adecuada en un disolvente de perfluoropolíéter y se usó tal como se suministró.

Los revestimientos se aplicaron de una de dos formas, ambas destinadas a minimizar la posibilidad de que el revestimiento entrara en contacto con el fondo de los pocillos. En ambos métodos, el revestimiento se aplicó a una placa con el fondo de la placa orientado aproximadamente de 1° a 5° desde la vertical y la placa girando en el plano del fondo de la placa. Es preferible que el revestimiento no llegue al fondo de los pocillos, ya que un fondo de pocillo hidrófobo puede hacer que el fluido del pocillo se retraiga de la pared, provocando un menisco cóncavo fuerte y reduciendo el área total del fondo del pocillo cubierta. Esto, a su vez, da como resultado una interferencia óptica para obtener imágenes del pocillo.

Para el primer método de aplicación de revestimiento, el revestimiento a base de siloxano se diluyó en hexano hasta una concentración adecuada para reducir la viscosidad para facilitar la dispersión sobre la superficie de la pared del pocillo. Los revestimientos se aplicaron con una pipeta manual a la pared de cada pocillo mientras giraban a una velocidad de 8RPM. Se aplicó un volumen de aproximadamente 200uL de revestimiento a cada pocillo durante un período de aproximadamente 1/4 a 3/4 de giro del pocillo. El revestimiento se agregó al punto más bajo de la pared del pocillo horizontal. La viscosidad del revestimiento y la velocidad de giro se establecieron de modo que el volumen del revestimiento fluiría hacia abajo y se dispersaría uniformemente sobre la pared a medida que giraba. Este método permitió la evaporación del disolvente para proporcionar un revestimiento uniforme alrededor de la circunferencia de la pared por encima del escalón mientras evitaba la migración del revestimiento debajo de la cara de escalón. Las placas se dejaron girar durante 5-30 minutos para eliminar el disolvente residual por evaporación, dejando una capa uniforme alrededor de la pared del pocillo por encima del escalón. A continuación, las placas se transfirieron a un horno a 70°C durante al menos 2 horas para el curado, lo que dio como resultado una película sólida hidrófoba o superhidrófoba por encima de la superficie de escalón sin revestimiento debajo de la superficie de escalón.

Se evaluó un segundo método de aplicación de revestimiento para el revestimiento hidrófobo a base de siloxano. En este método, se aplicó una formulación sin disolvente de la solución de siloxano/reticulante/catalizador directamente a la pared del pocillo mediante la dispensación a través de una punta de pipeta unida a una bomba peristáltica con un tubo flexible. Como en el método anterior, la placa se mantuvo en una orientación de modo que el plano del fondo de la placa fuera aproximadamente vertical, y luego se hizo girar alrededor de un eje perpendicular al fondo de la placa. La punta de la pipeta se alineó para dispensar el revestimiento en el punto más bajo de la pared del pocillo y se desplazó aproximadamente 2mm desde la cara (142) de escalón horizontal. La dispensación de la solución de revestimiento comenzó cuando el pocillo giró alrededor de su eje. La placa se retiró simultáneamente de la punta de modo que se aplicó una capa helicoidal continua con un paso de 1,5 a 2mm de revestimiento. El pocillo giró unas 4 veces para depositar entre 12 y 60uL de material de revestimiento antes de que se detuviera la dispensación de la solución de revestimiento. A continuación, se colocó la placa sobre una mesa en orientación horizontal y se dejó asentar el revestimiento hasta 2 horas. Esto dio como resultado la dispersión de la capa helicoidal de la solución de revestimiento a una película continua sobre la pared del pocillo que engrosó en la dirección del fondo del pocillo, con algo de revestimiento acumulándose en la cara (142) superior de escalón. El grosor del revestimiento se evaluó cualitativamente a simple vista. Esta evaluación cualitativa fue asistida por la adición del tinte azul Holcosil LSR Blue al material de revestimiento (Holland Colors, VA). Un volumen de revestimiento de aproximadamente 20 a 25uL dio como resultado el revestimiento más uniforme sin provocar que el revestimiento rebasa la cara (142) de escalón. Después de asentarse, el revestimiento se curó en un horno a 70°C durante al menos 2 horas.

Las placas de pocillos escalonados revestidas con materiales tanto hidrófobos como superhidrófobos y con cualquiera de los dos métodos (para el caso del revestimiento de siloxano hidrófobo) dieron una excelente reducción de menisco usando medios de cultivo celular semisólidos. Se añadió aproximadamente 1mL de Methocult<sup>MR</sup> (Stemcell Technologies, Canadá) a cada pocillo y se colocó la placa en una incubadora humidificada durante 7 a 12 días. A continuación, se tomaron imágenes de las placas y se analizaron como se describe en el Ejemplo 1.

Para el primer método de aplicación de revestimiento, la magnitud del menisco como porcentaje del área del pocillo fue de aproximadamente 0% para los materiales de revestimiento Cytonix y Dehesive después de 7 y 12 días en la incubadora, mientras que los pocillos de control revestidos con siloxano que carecían de una característica de escalón mostraron un % de área de menisco del 3% después de la incubación. Además, los pocillos escalonados de control sin revestimiento mostraron un % de área de menisco del 29% después de la incubación. Por tanto, el revestimiento en combinación con la característica de escalón dio como resultado una mejor reducción de menisco que la característica de escalón sola. El revestimiento en combinación con la característica de escalón también dio como resultado una mejor reducción de menisco que el revestimiento solo (como se muestra en la figura 7).

La figura 8 muestra la magnitud del menisco como un % de cobertura del pocillo para n=206 pocillos preparados siguiendo el segundo método de aplicación de revestimiento de este ejemplo. El % medio del área de menisco fue del 0,3%. Nuevamente, el revestimiento aplicado usando el segundo método de aplicación, en combinación con la característica de escalón, dio como resultado una mejor reducción del menisco que la característica de escalón sola y el revestimiento solo. Estos resultados indican que tanto el revestimiento como la característica de escalón pueden cooperar para dar una reducción completa del menisco.

Se ha pretendido que lo descrito anteriormente sea ilustrativo de la invención y no limitativo y los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar otras variantes y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas. El alcance de las reivindicaciones no debería estar limitado por los modos de realización y ejemplos preferidos, sino que debería recibir la interpretación más amplia coherente con la descripción en su conjunto.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para proporcionar un miembro (132, 1132) reductor de menisco para usar en un recipiente (100) para contener un líquido (102) acuoso de acuerdo con la reivindicación 4, el método que comprende:

5 a) proporcionar una característica (134,1134) de la superficie física que tiene superficies interiores anulares primera (138,1138) y segunda (140,1140) que son paralelas y separadas entre sí y al menos una tercera superficie (142,1142) que se extiende entre la primera (138,1138) y la segunda (140,1140) superficies interiores, la tercera superficie (142,1142) que se cruza tanto con la primera (138,1138) como con la segunda (140,1140) superficies interiores, la característica (134,1134) de la superficie física configurada para alterar físicamente un ángulo (116) de contacto de retroceso entre un líquido (102) y la característica (134,1134) de la superficie física, en donde la primera superficie (138,1138) interior está colocada sobre la segunda superficie (140,1140) interior y un borde (144,1144) de escalón está definido por la intersección de la segunda superficie (140,1140) interior y la tercera superficie (142,1142), y preferiblemente en donde la segunda superficie (140,1140) interior está desplazada lateralmente hacia dentro desde la primera superficie (138,1138) interior y, opcionalmente, en donde la tercera superficie (142,1142) está

- perpendicular a la primera (138,1138) y segunda (140,1140) superficies interiores o
- 15 • inclinada en un ángulo oblicuo a la primera (138,1138) y segunda (140,1140) superficies interiores; y

b) revestir la primera superficie (138,1138) interior y la tercera superficie (142,1142) con un material de revestimiento de superficie, para modificar el ángulo (116) de contacto de retroceso entre el líquido (102) y la primera superficie ((138, 1138) interior y la tercera superficie (142,1142) de la característica (134,1134) de la superficie física que está revestida con el material de revestimiento, y en donde el material de revestimiento comprende al menos uno de un revestimiento a base de siloxano, un agente de fluoropolímero, una cera, un ácido graso saturado de tipo cera, un ácido graso saturado o insaturado de tipo no cera, un revestimiento de suspensión de partículas superhidrófobas o un revestimiento basado en nanopartículas.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además girar la característica (134, 1134) de la superficie física alrededor de un eje de giro a una velocidad de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25 revoluciones por minuto mientras se aplica el material de revestimiento a la al menos una de la primera superficie (138,1138) interior, la segunda superficie (140,1140) interior y la tercera superficie (142,1142) y preferiblemente en donde el eje de giro forma un ángulo de entre 0 grados y 5 grados con respecto a un eje vertical.

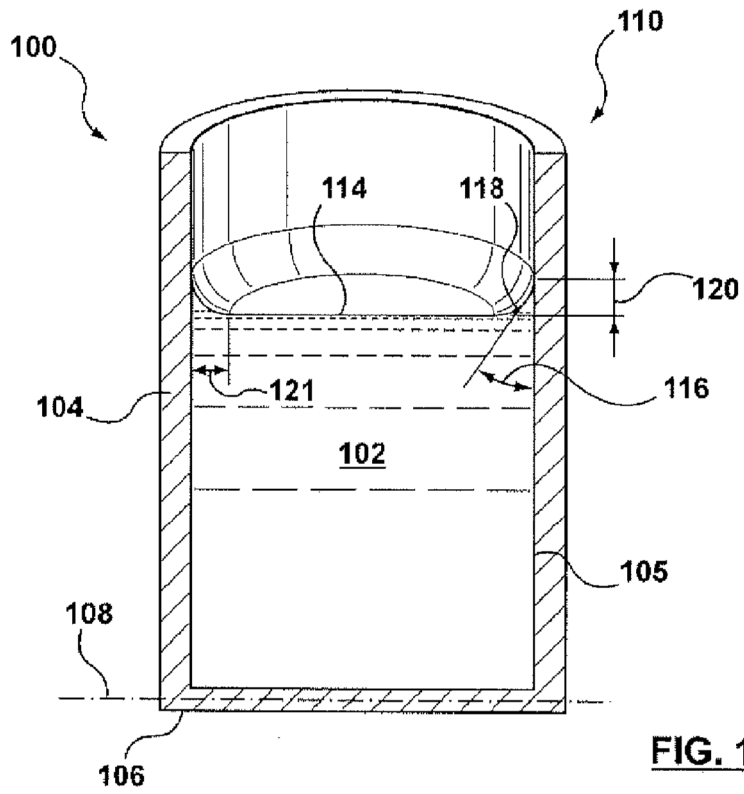
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el material de revestimiento se aplica como una capa generalmente continua de material de revestimiento en la al menos una de la primera superficie (138,1138) interior, la segunda superficie (140,1140) interior y la tercera superficie (142,1142) y preferiblemente que comprende además trasladar axialmente el miembro (132,1132) reductor de menisco mientras se aplica la capa generalmente continua de material de revestimiento para proporcionar una capa generalmente helicoidal de material de revestimiento en la al menos una de la primera superficie (138,1138) interior, segunda superficie (140,1140) interior y la tercera superficie (142,1142).

4. Un miembro (132,1132) reductor de menisco para usar en un recipiente (100) para contener un líquido (102) acuoso, el miembro (132,1132) reductor de menisco que comprende:

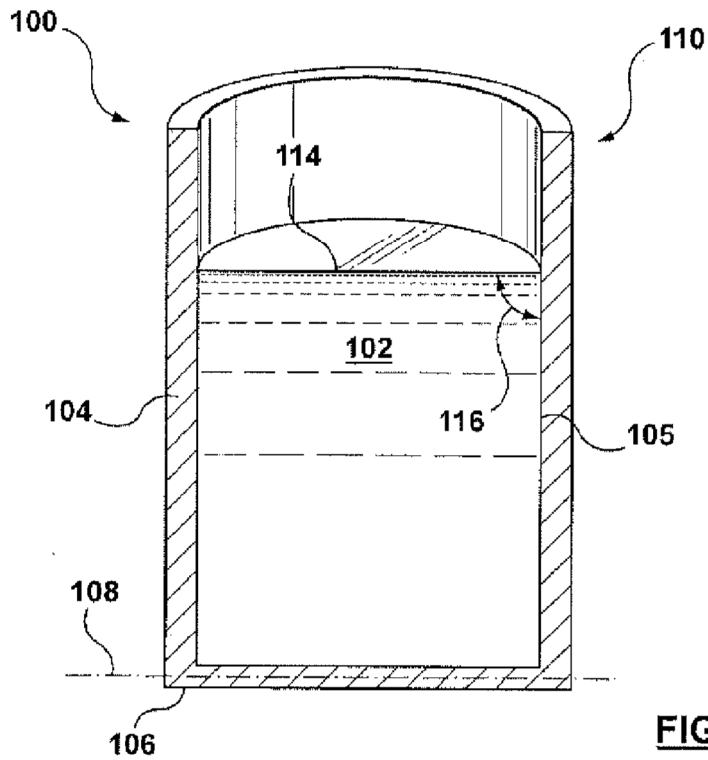
a) una característica (134,1134) de la superficie física configurada para superponerse a al menos una porción de una superficie (105) interior de un recipiente (100) para acoplar una superficie libre de un líquido (102) acuoso en el recipiente (100), la característica (134,1134) de la superficie física que incluye superficies interiores anulares primera (138,1138) y segunda (140,1140) que están paralelas y separadas entre sí y al menos una tercera superficie (142,1142) que se extiende entre la primera (138,1138) y segunda (140,1140) superficies, la tercera superficie (142,1142) que se cruza tanto con la primera (138,1138) como con la segunda (140,1140) superficies interiores, la primera superficie (138,1138) interior, segunda superficie (140,1140) interior y terceras superficies (142,1142) configuradas para alterar físicamente un ángulo (116) de contacto de retroceso entre el líquido (102) y la característica (134,1134) de la superficie física, en donde la primera superficie (138,1138) interior está colocada por encima de la segunda superficie (140,1140) interior y un borde (144,1144) de escalón está definido por la intersección de la segunda superficie (140,1140) interior y la tercera superficie (142,1142), y preferiblemente en donde la segunda superficie (140,1140) interior está desplazada lateralmente hacia dentro de la primera superficie (138,1138) interior; y

b) un material de revestimiento aplicado a la primera superficie (138,1138) interior y la tercera superficie (142,1142) de la característica (134,1134) de la superficie física para modificar el ángulo (116) de contacto de retroceso entre el líquido (102) y la primera superficie (138,1138) interior y la tercera superficie (142,1142) de la característica (134,1134) de la superficie física que está revestida con el material de revestimiento, por lo que un ángulo (117) de interfase formado entre el líquido (102) donde contacta con el miembro (132,1132) reductor de menisco y un plano paralelo a la primera superficie (138,1138) interior está entre 75 grados y 110 grados, y preferiblemente en donde el ángulo (117) de interfase formado entre el líquido (102) donde contacta con el miembro (132,1132) reductor de menisco y un plano paralelo a la primera superficie (138,1138) interior es de 90 grados y en donde el material de revestimiento comprende al menos uno de un revestimiento a base de siloxano, un agente de fluoropolímero, una cera, un ácido graso saturado de tipo cera, un ácido graso saturado o insaturado de tipo no cera, un revestimiento de suspensión de partículas superhidrófobas o un revestimiento basado en nanopartículas.

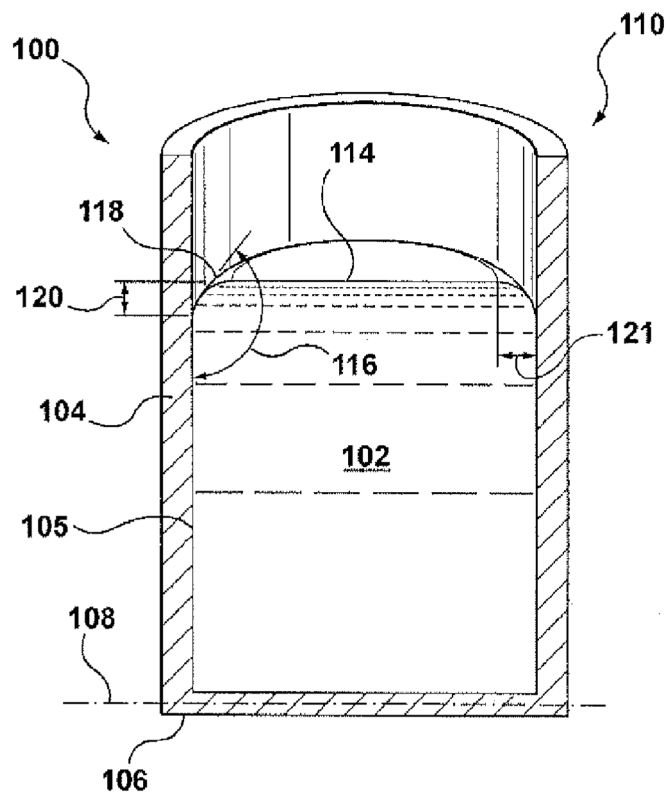
5. El miembro (132,1132) reductor de menisco de la reivindicación 4, en donde el ángulo (117) de interfase formado entre el líquido (102) donde hace contacto con el miembro (132,1132) reductor de menisco y un plano paralelo a la primera superficie (138,1138) interior está más cerca de 90 grados que un ángulo (116) de contacto de retroceso formado entre el líquido (102) y la característica (134,1134) de la superficie física en ausencia del material de revestimiento.
6. El miembro (132,1132) reductor de menisco de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde la tercera superficie (142,1142) es perpendicular tanto a la primera (138,1138) como a la segunda (140,1140) superficies interiores o está inclinada formando un ángulo oblicuo con la primera (138,1138) y la segunda (140,1140) superficies interiores.
7. El miembro (132,1132) reductor de menisco de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la primera superficie (138,1138) interior está al menos parcialmente revestida con el material de revestimiento y la segunda superficie (140,1140) interior está esencialmente libre del material de revestimiento.
8. El miembro (132,1132) reductor de menisco de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde el material de revestimiento comprende una solución que contiene al menos 63% en peso de uno o más de metil perfluorobutiletíl siloxano, metilhidrógeno siloxano, dimetil siloxano y metil vinil siloxano reticulado con una solución reticulante que comprende al menos 60% en peso de metil (perfluorobutiletíl) siloxano terminado en trimetilsiloxi y metilhidrógeno siloxano terminado en trimetilsiloxi.
9. El miembro (132,1132) reductor de menisco de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde la tercera superficie (142,1142) está curvada.
10. El miembro (132,1132) de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde el líquido acuoso incluye uno o más de sales, azúcares, proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, metilcelulosa, agar, colágeno u otros agentes gelificantes.
11. Un recipiente (100) que comprende:
- a) una pared (106) inferior cerrada y una pared (104) lateral que se extiende desde la pared (106) inferior hasta una porción superior abierta para retener un volumen de líquido (102) dentro del recipiente (100), la pared (104) lateral que comprende una superficie (105) interior; y
- b) el miembro (132, 1132) reductor de menisco de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10.



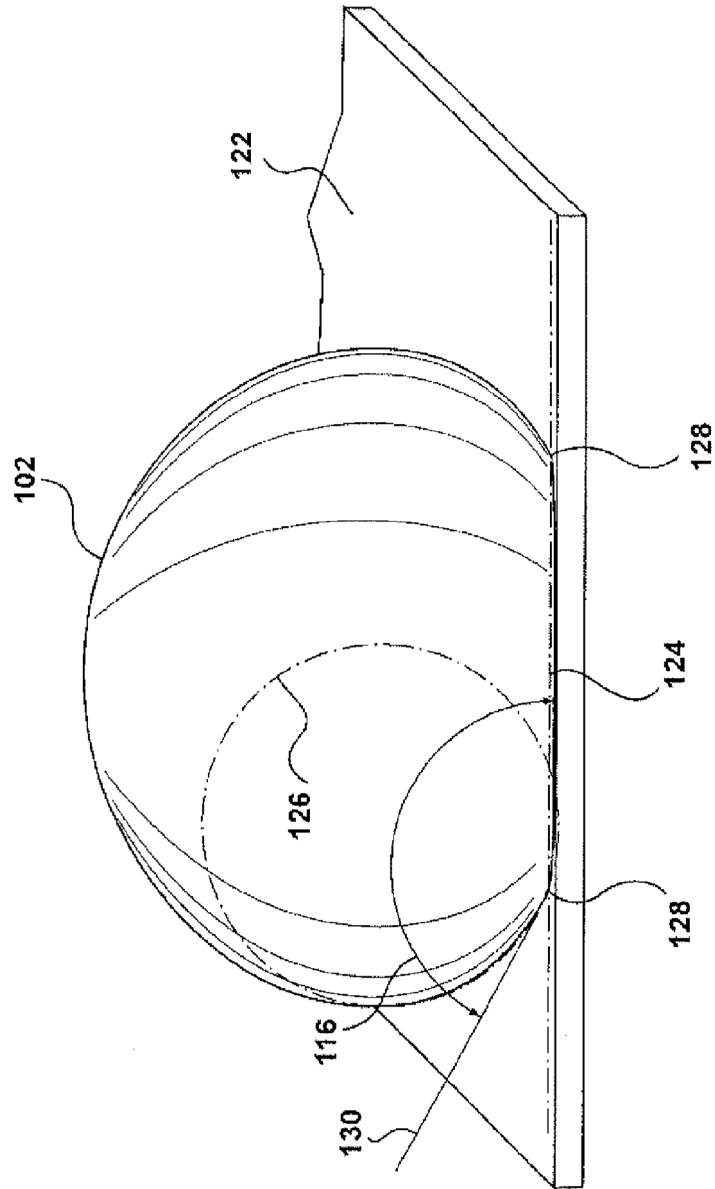
**FIG. 1a**



**FIG. 1b**



**FIG. 1c**



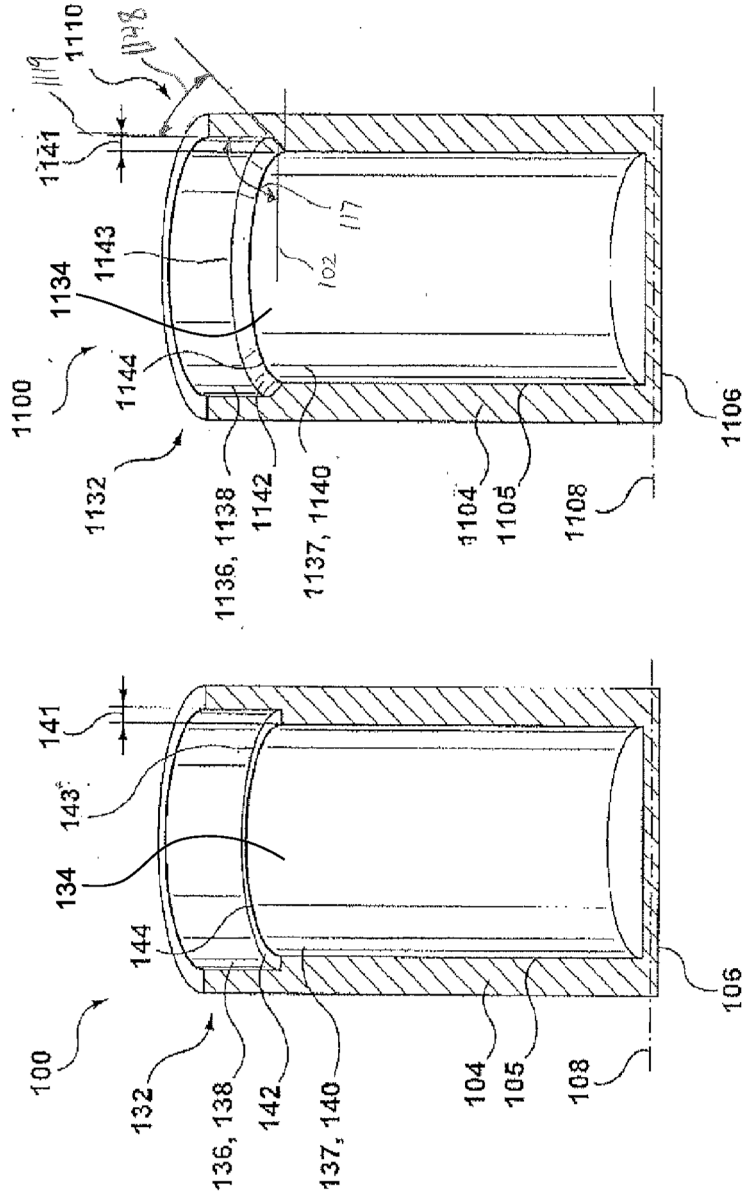


FIG. 4

FIG. 3

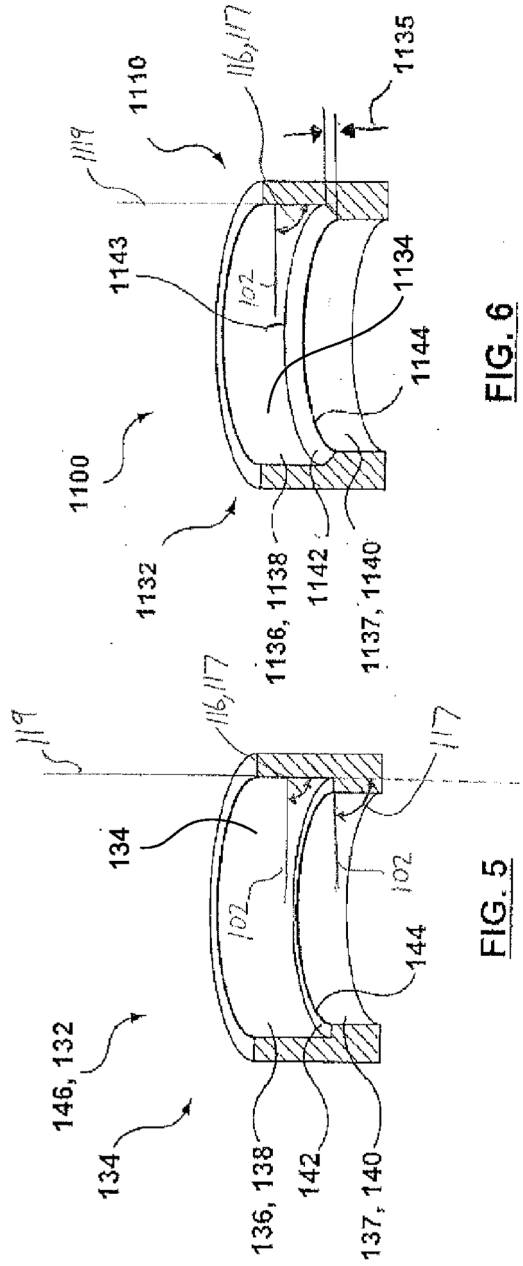


FIG. 6

FIG. 5

Figura 7

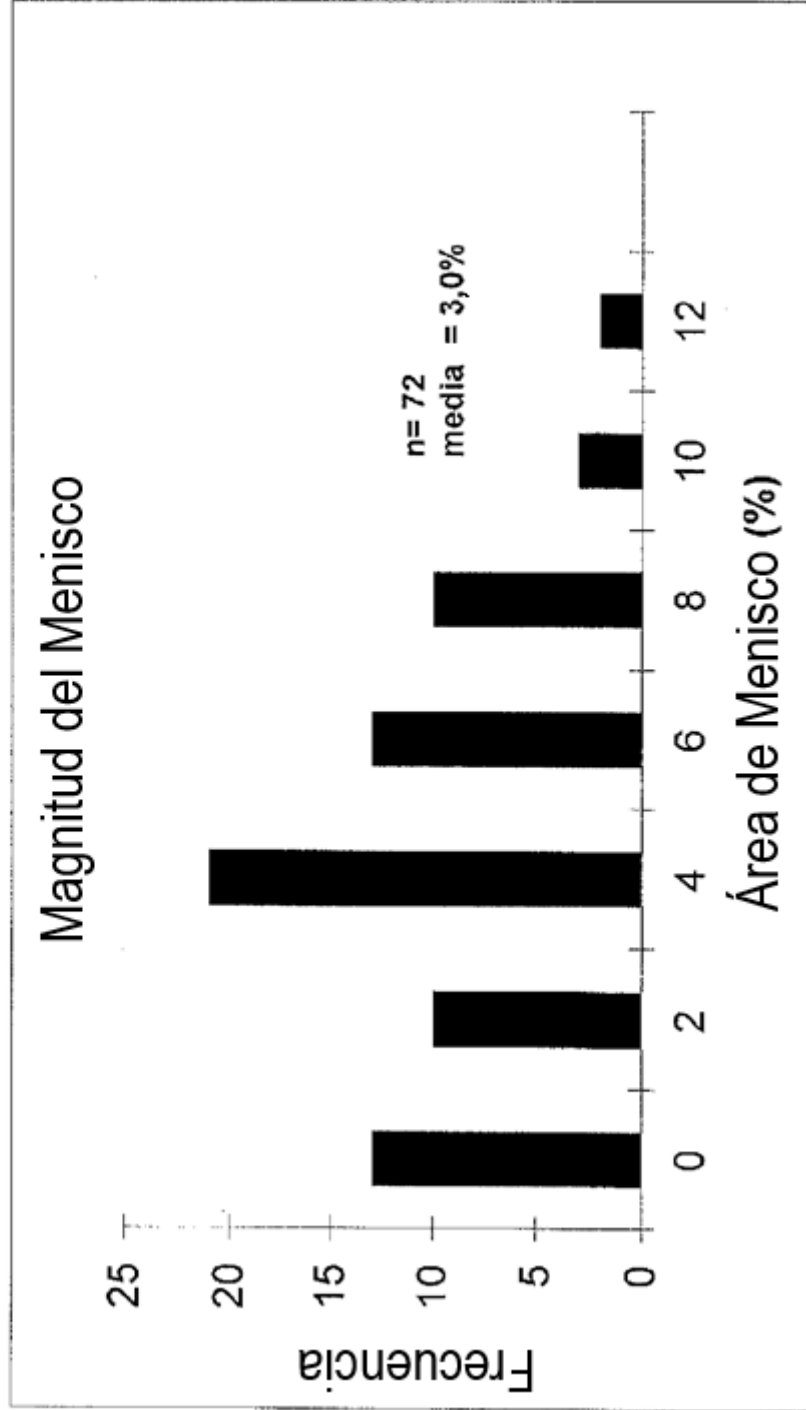


Figura 8

