



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 294 536**

51 Int. Cl.:
C12M 1/33 (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01)
C12N 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04768374 .3**
86 Fecha de presentación : **07.09.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1664264**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Aparato para la destrucción de microbios por ultrasonidos.**

30 Prioridad: **08.09.2003 GB 0320954**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

73 Titular/es:
THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE
DSTL Porton Down
Salisbury, Wiltshire SP4 0JQ, GB

72 Inventor/es: **Coakley, William Terence;**
Borthwick, Kathryn Amelia J.;
McDonnell, Martin Bernard y
Love, Tracey Elizabeth

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 294 536 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).

ES 2 294 536 T3

DESCRIPCIÓN

Aparato para la destrucción de microbios por ultrasonidos.

5 La presente invención se refiere en general a un aparato para la destrucción de microbios mediante la exposición a ultrasonido focalizado radialmente. La presente invención está dirigida en particular, aunque no exclusivamente, a un aparato compacto adecuado para su uso para ayudar a la detección y análisis de bacterias patógenas.

10 Los dispositivos disponibles comercialmente para la destrucción de microorganismos por cavitación ultrasónica comprenden aplicadores resonantes a 20 kHz. Las sondas de media longitud de onda (transmisión máxima) tienen a menudo una longitud de aproximadamente 15 cm y, por tanto, son voluminosos e incómodos de usar cuando han de ser destruidos pequeños volúmenes de muestra de bacterias patógenas. Además, puesto que las sondas deben ser sumergidas en una muestra de líquido de estas bacterias hay un riesgo inherente de formación de un aerosol peligroso.

15 Son conocidos más dispositivos de destrucción de células compactos que operan a mayores frecuencias. Por ejemplo, un destructor de células de bacterias que usa energía ultrasónica transmitida desde una bocina a través de una interfaz con el líquido de película fina, flexible (Taylor, M.T. *et al.*, Anal Chem. 2001, 73, 492-496) opera a 40 kHz. Además es conocido un destructor de células que comprende un segmento de 160° de un transductor tubular de espesor asociado a 1 Mhz que focaliza el sonido a través del agua a una suspensión de esporas en un tubo de plástico estrecho (Chandler *et al. ibid.*, 2001, 73, 3784-3789). La patente US 6506584 describe un instrumento de alta frecuencia para la destrucción de microbios que evita la cavitación convencional y que comprende un transductor con forma de segmento circular que tiene en la superficie interior una capa de transmisión la cual define un canal para la recepción de una muestra líquida.

25 Sin embargo, aunque cada uno de estos dispositivos destruye eficazmente las bacterias mediante altas presiones de sonido, generan una cantidad significativa de calor que conduce a una elevación sustancial de la temperatura de la muestra de 50 a 90°C. Tales altas temperaturas son tolerables si el propósito de la destrucción es extraer ADN para análisis PCR pero son nocivas para la antigenicidad de, por ejemplo, un antígeno de proteína.

30 La destrucción de bacterias que facilita los inmunoanálisis de proteína y de fragmentos de pared celular ofrece, sin embargo, la ventaja significativa de que es detectable potencialmente un gran número de fragmentos potenciales.

La presente invención, por tanto, busca en general proporcionar un aparato compacto que permita la rápida destrucción de microbios, por ejemplo bacterias, en una muestra líquida con una elevación de la temperatura mínima.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona un aparato para destrucción de microbios por ultrasonidos, que comprende un transductor cilíndrico que tiene una capa de transmisión sólida conductora del calor dispuesta a lo largo de al menos una parte de su superficie longitudinal interior, definiendo dicha capa de transmisión o dicho transductor y capa de transmisión un canal para la recepción de una muestra líquida, y medios capaces de suministrar un potencial alterno a dicho transductor a una frecuencia y voltaje que produce resonancia e induce cavitación en dicha muestra líquida.

45 Según se usa en la presente memoria, el término "muestra líquida" se refiere a una suspensión de un microbio, por ejemplo, bacterias o esporas, en un líquido, normalmente agua.

Se entenderá que la frecuencia de accionamiento necesaria para producir uno o más estados resonantes depende del material y del espesor de la pared del transductor y la capa de transmisión, así como del diámetro o ancho del canal (o espesor de la capa de muestra).

50 La pared del transductor tendrá normalmente como espesor aproximadamente un múltiplo integral impar de la longitud de media longitud de onda del sonido en su interior. El espesor no está limitado de otra forma excepto por el requisito de resonancia y aparato compacto.

55 Preferiblemente, la capa de transmisión tiene un espesor de aproximadamente un múltiplo integral (par o impar) de media longitud de onda del sonido en su interior para maximizar la transmisión de la onda sonora. Mas preferiblemente, la capa de transmisión tiene un espesor de aproximadamente media longitud de onda del sonido en su interior. El espesor no tiene otra limitación excepto el requisito de resonancia y de aparato compacto.

60 El ancho o diámetro del canal es también seleccionado para permitir la resonancia. Preferiblemente, el ancho o diámetro facilita la cavitación en un volumen razonable de la muestra líquida mientras que lo mantiene en la región de focalización del transductor. Aún más preferiblemente, el ancho o diámetro del canal soporta buena transferencia de calor a la capa de transmisión desde gran parte de la muestra líquida.

65 La capacidad del transductor cilíndrico, accionado en modo radial, de proporcionar presiones de sonido altas en su región de focalización (en o adyacentes al eje longitudinal) depende de su diámetro exterior. El diámetro es, por tanto, preferiblemente tan grande como sea posible mientras que satisfaga el requisito de aparato compacto, particularmente donde el espesor de la capa de transmisión es grande.

ES 2 294 536 T3

La extensión longitudinal del transductor no está limitada según la presente invención salvo en cuanto al requisito de compacidad. Preferiblemente, la longitud proporciona un grado de uniformidad de densidad de energía a lo largo del canal sin detrimento de su impedancia.

- 5 Un transductor cilíndrico preferido (PZT4D, 298 kHz, Vernitron, Southampton, RU) comprende una piezocerámica tubular que tiene un espesor de pared de aproximadamente 6,5 mm, un diámetro exterior de aproximadamente 63,7 mm y una longitud de aproximadamente 25,6 mm.

10 La capa de transmisión puede estar dispuesta a lo largo de una porción o segmento de la superficie interior del transductor cilíndrico. En particular, la capa de transmisión puede comprender un semicilindro dispuesto a través de la mitad de su superficie interior. En una realización preferida, sin embargo, la capa de transmisión comprende un tubo cilíndrico completo. La realización preferida es de máxima eficacia en comparación con una capa de transmisión líquida o líquida en parte en la que la cavitación en su interior se evita.

15 Es evidente que la capa de transmisión sola o el transductor y la capa de transmisión juntos definen un canal. En una realización preferida, el canal está definido por la capa de transmisión y es de sección transversal circular y concéntrico con el eje longitudinal del transductor cilíndrico. En esta realización se obtiene un buen solapamiento de una muestra líquida introducida con la región de focalización. Sin embargo, se prevén otras disposiciones en las que el canal es desplazado del eje longitudinal del transductor cilíndrico y/o no son circulares.

20 La capa de transmisión puede comprender cualquier material conductor del calor adecuado. El material conduce el calor fuera de la muestra controlando así el calentamiento rápido de la muestra a tales presiones altas. Preferiblemente, la dimensión longitudinal de la capa de transmisión excede a la del transductor para asegurar que el calor es conducido bien fuera de la región de focalización. Materiales de transmisión y conducción adecuados comprenden metal o aleaciones de metal tales como acero.

25 Una capa de transmisión preferida comprende un cilindro de acero que tiene un diámetro exterior de aproximadamente 50,5 mm, un diámetro interior de aproximadamente 3,8 mm y una longitud de aproximadamente 31,9 mm. El espesor de pared de la capa de transmisión es de aproximadamente 20,5 mm (media longitud de onda).

30 La capa de transmisión será asegurada normalmente a la superficie interior del transductor cilíndrico por un adhesivo adecuado tal como resina epoxídica. En particular, el cilindro de acero preferido puede ser recubierto con una resina epoxídica con plata conductora y el transductor cilíndrico es desplazado hacia delante con cuidado.

35 El transductor cilíndrico preferido y la capa de transmisión preferida proporcionan cavitación significativa en una muestra líquida en tres frecuencias según se determina por observación estereoscópica. La frecuencia inferior de 266 kHz se produce próxima a la predicción de una frecuencia de resonancia en un modelo de resonancia multicapa de acuerdo con una matriz de transferencia de dimensión 1. La cavitación significativa se produce también a 297 kHz y 314 kHz, coincide con resonancias eléctricas medidas y son próximas al espesor nominal asociado a 298 kHz del transductor.

40 Una frecuencia de accionamiento preferida es 266 kHz, aunque la destrucción de células de bacterias comparable se obtiene a 297 kHz.

45 En una realización el aparato comprende además medios para suministrar un flujo de muestra a través del canal, por ejemplo una disposición de tubo y bomba. En una realización alternativa, el aparato está adaptado, por ejemplo por medios de clausura o medios de válvula, para mantener la muestra líquida en el canal y permitir el procesamiento por lotes.

50 En otras realizaciones, el aparato comprende además medios de enfriamiento que facilitan la eliminación de calor de la muestra líquida. Los medios de enfriamiento pueden, por ejemplo, comprender un disipador de calor de rejilla acoplado a la capa de transmisión por una grasa adecuada y uno o más sopladores.

55 En una realización, para el procesamiento por lotes en el que el transductor cilíndrico está vertical en uso, es adecuado un primer soplador que sopla aire a través del aparato y a través de un disipador de calor dispuesto en contacto térmico con el cilindro de acero. Un segundo soplador sopla aire hacia abajo desde por encima del aparato.

60 La presente invención proporciona también un método para la destrucción de microbios que comprende: i) introducir una muestra líquida al aparato que comprende un transductor cilíndrico que tiene una capa de transmisión sólida conductora del calor a lo largo de al menos una parte de su superficie longitudinal interior, definiendo dicha capa de transmisión o dicho transductor y capa de transmisión un canal que recibe dicha muestra y ii) aplicar un potencial alterno a dicho transductor a una frecuencia y voltaje que produzcan resonancia e induzcan cavitación en dicha muestra líquida.

65 El método puede ser realizado con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente del aparato de la presente invención. La frecuencia del potencial alterno es determinada, en la práctica, por un barrido controlado por ordenador a potenciales particulares y observación óptica/aural de la cavitación. Potenciales aplicados adecuados para obtener un rango de resonancia fuerte varían de 30 a 100 V_{rms}.

ES 2 294 536 T3

En una realización preferida, el método es realizado con un rango de frecuencias de accionamiento que varía entre 264 y 314 kHz, óptimamente 266 kHz, a aproximadamente 80 V_{rms}.

5 El método de la presente invención puede ser realizado como un proceso por lotes o continuo. Para un proceso por lotes, el aparato es dispuesto verticalmente con el líquido de la muestra retenido en el canal, por ejemplo, por una película de plástico fino y un aro de sujeción. La muestra líquida es después tratada con ultrasonidos a una frecuencia óptima determinada durante uno o más periodos de tiempo. El número y extensión de los periodos de tiempo son seleccionados para minimizar el calentamiento de la muestra líquida y maximizar la destrucción celular.

10 Un proceso continuo es adecuado donde la extensión de la destrucción celular es alta durante un corto periodo de tiempo. Para el aparato preferido se prevén tasas de flujo de aproximadamente 1ml/min de una muestra líquida que contiene esporas de bacterias. El proceso continuo, por tanto, ofrece el potencial de integración de destrucción celular para la detección de tecnologías que emplean técnicas de flujo.

15 La presente invención será descrita ahora por medio del ejemplo sólo con referencia a los siguientes ejemplos y dibujos en los que:

Fig. 1, es una vista en alzado frontal del aparato según la realización preferida de la presente invención;

20 Figs. 2 a) y b) son, respectivamente, una vista final y en sección del aparato de la Fig. 1;

Fig. 3, es una gráfica que muestra la impedancia eléctrica trazada respecto a la frecuencia para el aparato de la Fig. 1;

25 Fig. 4, es una gráfica que muestra la extensión de la destrucción de *Saccharomyces cerevisiae* a lo largo del tiempo usando el aparato de la Fig. 1; y

30 Figs. 5a), b) y c) son, respectivamente, gráficas que muestran la detección de antígenos de spora *Bacillus subtilis* var. *niger* (BG) medida por espectroscopia de adsorción usando el aparato de la Fig. 1 y dos destructores de microbios ultrasónicos de 20 kHz disponibles comercialmente.

35 Con referencia ahora a las figuras 1 y 2, una realización preferida de la presente invención comprende un transductor cerámico 11 cilíndrico de 25,58 mm de longitud (PZT4D, 298 kHz, Vernitron, Southampton, RU) de diámetro exterior 63,76 mm y espesor de pared 6,52 mm. El transductor cilíndrico está ajustado con un cilindro de acero 12 de 31,91 mm de longitud, diámetro exterior 50,50 mm y diámetro interior 3,8. El cilindro define un canal 13 (Fig. 1, línea de trazos) para la recepción de una muestra líquida 15 a través de porciones tubulares 14 sobresalientes dispuestas en las superficies superior e inferior del cilindro de acero.

40 El cilindro de acero está asegurado al transductor cilíndrico por una resina epoxídica con plata conductora 16. Una fuente de potencial alterno (no mostrada) que comprende un generador de ondas (modelo HP 33120A de Agilent) y un amplificador (Modelo 240L, ENI, Rochester, NY) suministra al transductor un potencial alterno que varía desde aproximadamente 30 a 100 V_{rms}.

45 Las mediciones de impedancia eléctrica y el tratamiento del sistema cilíndrico acústico de múltiples capas como un sistema plano (cargado con agua) según un modelo de resonador de matriz de transferencia de dimensión 1 (Hawkes J.J. *et al.*, Ultrasonics, 2002, 40, 385-392) predijeron frecuencias a las que la cavitación era fuerte en buena concordancia con aquellas encontradas experimentalmente.

50 La Fig. 3 muestra la dependencia de la frecuencia de mediciones de admitancia eléctrica (línea de trazos) y un espectro de onda plana simulado por el modelo. La actividad de alta cavitación (indicada por flechas) se puede ver en una banda de 4 kHz centrada en 266 kHz, en aproximadamente 297 kHz y en 314 kHz.

55 La dependencia de la frecuencia de destrucción de una suspensión tamponada diluida de eritrocitos humanos tenía el orden $266 \geq 297 > 314$ kHz. El hecho de que la frecuencia más alta mostraba la mínima destrucción puede ser debido a una menor adaptación eficaz al amplificador para bajas impedancias a esta frecuencia.

Ejemplo 1

60 El procesamiento por lotes de muestras líquidas de 0,6 ml que contienen una suspensión de la variedad de levadura *Saccharomyces cerevisiae* D1 en agua fue realizada a una frecuencia de accionamiento de 266 kHz a 80 V_{rms}.

65 Las muestras fueron preparadas haciendo crecer la levadura en medio YEPD (extracto de levadura, dextrosa, peptona) (10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona bacteriológica, 20 g de glucosa, 0,1 g de adenina y 0,1 g de uracil en 1 l de agua desionizada) en un agitador orbital (150 rpm; 25°C durante 48 horas, agitador incubador Mk X, LH Engineering Co, Ltd.) Las células fueron lavadas dos veces por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min y después fueron suspendidas otra vez en agua destilada.

ES 2 294 536 T3

El análisis Folin-Ciocalteu modificado Lowry fue usado para determinar la acumulación de la proteína liberada en el sobrenadante de la muestra. La observación al microscopio (x20 y x40) de células teñidas con azul de metileno fue usada para determinar el número de células viables y visualizar cualquier material de pared celular destruido.

5 La destrucción de estas muestras de levadura a través del tiempo se muestra en la Fig. 4. Como puede verse, la liberación de proteína es rápida durante los primeros 30 segundos de tratamiento con ultrasonidos. La observación al microscopio (x 40) mostró células rotas a 60 s. El aumento de temperatura fue medido como 13 K después de 3 min. La destrucción fue comparable a la conseguida con muestras líquidas de 2,4 ml usando un destructor de microbios ultrasónico de 20 kHz disponible comercialmente.

10

Ejemplo 2

Fue preparada una suspensión de esporas de BG lavadas suspendida en agua destilada esterilizada (10^{10} ufc/ml a 10^{11} ufc/ml).

15

El procesamiento por lotes de esta solución fue realizado en a) 0,6 ml a 266 kHz, 80 V_{rms} b) 2,4 ml a 20 kHz (vaso de precipitado sobre hielo usando una sonda de titanio de diámetro 9,54 mm accionada a 60W; MSE Ltd, Londres, RU) y c) 100 ul que contiene una suspensión de 0,5 mg de 106 μ M de perlas lavadas en ácido en tubos smartcylcer a 20 kHz usando una sonda de titanio de 6 mm de diámetro accionada a 100% de amplitud (Cepheid, California, EEUU).

20

La disponibilidad de antígenos de esporas fue determinada en varios intervalos de tiempo por inmunoanálisis basándose en ELISA directo utilizando un anticuerpo policlonal de conejo α -BG elevado frente a esporas BG completas. Las muestras de las esporas fueron recubiertas en placas de cultivo de 96 pozos, diluidas en tampón de bicarbonato, pH 9 e incubadas durante la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas (x 3 PBS Tween 20, 0,05% y x 1 PBS) y después bloqueadas. (1% polvo de leche, PBS Tween 20, 0,05% durante 2 h a temperatura ambiente). La adición del anticuerpo a una concentración final de 10 μ g/ml en cada pozo, incubación (1 h a temperatura ambiente) y lavado (como antes) fue seguida por adición de un HRP de conejo conjugado. Después de la incubación (1 h a temperatura ambiente) la placa fue lavada (x 4, PBS Tween 0,05% y x 1 PBS) y añadido tampón para el desarrollo de ABTS. Después de la incubación durante un periodo suficiente para que se produzca el desarrollo, la absorción de las muestras fue medida a 405 nm de longitud de onda.

30

La Fig. 5 destaca la mejora en la sensibilidad del análisis a antígeno de BG que sigue al tratamiento con ultrasonidos para cada aparato a-c durante 30 s (la sensibilidad del análisis se encontró que era mayor después de 30 s, lo que sugiere que la desnaturalización se produce con períodos de tratamiento con ultrasonidos más largos).

35

Con referencia ahora a cada gráfica de la Fig. 5, la línea horizontal dibujada entre las curvas en unidades A⁴⁰⁵ 0,1 sugiere un incremento de quince veces en la sensibilidad del ensayo que sigue al tratamiento con ultrasonidos a 266 kHz. La mejora es al menos tan buena como la que se obtiene de acuerdo con b aunque algo más retardada de lo que se obtiene en c (veinte veces).

40

La liberación de proteína fue medida también a partir de muestras de esporas tratadas con ultrasonidos como se describió anteriormente. El modelo de liberación en a y b es muy similar aunque en b fue liberada una cantidad significativamente mayor de proteína. Se advierte que aunque la cantidad de proteína liberada aumenta constantemente a través del tiempo, el inmunoanálisis muestra que la antigenicidad de las muestras disminuye. La elevación de la temperatura en el aparato básico, el propio proceso de tratamiento con ultrasonidos o la liberación de otros componentes de esporas puede contribuir a esta pérdida.

45

El aparato compacto según la presente invención consigue resultados comparables a aparatos más grandes disponibles comercialmente. Además, el aparato reduce inherentemente el calentamiento nocivo de la muestra asociado a frecuencias mayores y la focalización radial de ultrasonido en comparación con la técnica anterior.

50

El control del calentamiento de la muestra en el aparato básico puede ser mejorado además por un enfriamiento asistido por un soplador como se describió antes. En particular, la elevación de la temperatura de una muestra puede ser mejorada desde 40°C después de 10 min a 11°C después de 1 hora de tratamiento continuo con ultrasonidos a 266 kHz, 80 V_{rms}.

55

60

65

ES 2 294 536 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Aparato para la destrucción de microbios, que comprende un transductor cilíndrico que tiene una capa de transmisión sólida, conductora del calor dispuesta a lo largo de al menos una parte de su superficie longitudinal interior, definiendo dicha capa de transmisión o dicho transductor y la capa de transmisión un canal para la recepción de una muestra líquida, y medios capaces de suministrar un potencial alterno a dicho transductor a una frecuencia y voltaje que produce resonancia e induce cavitación en dicha muestra líquida.
- 10 2. Aparato según la reivindicación 1, en el que la capa de transmisión tiene como espesor aproximadamente un múltiplo integral de media longitud de onda del sonido en su interior.
3. Aparato según la reivindicación 1 ó 2, en el que el transductor cilíndrico tiene un espesor de pared de aproximadamente 6,5 mm.
- 15 4. Aparato según la reivindicación 3, en el que el transductor cilíndrico tiene un diámetro exterior de aproximadamente 63,7 mm.
5. Aparato según cualquier reivindicación precedente, en el que la capa de transmisión comprende acero.
- 20 6. Aparato según la reivindicación 5, en el que la capa de transmisión comprende un tubo cilíndrico de extensión longitudinal mayor que el transductor cilíndrico, diámetro exterior de aproximadamente 50,5 mm y espesor de pared de aproximadamente 20,5 mm.
- 25 7. Aparato según la reivindicación 6, en el que el canal tiene un ancho o diámetro de aproximadamente 3,8 mm.
8. Aparato según cualquier reivindicación precedente, que incluye medios para cerrar dicho canal.
9. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además medios para suministrar la muestra a dicho canal.
- 30 10. Aparato según cualquier reivindicación precedente, que comprende además medios de enfriamiento.
- 35 11. Método para destrucción de microbios que comprende: introducir una muestra líquida en un aparato que comprende un transductor cilíndrico que tiene una capa de transmisión sólida conductora del calor a lo largo de al menos una parte de su superficie longitudinal interior, definiendo dicha capa de transmisión o dicho transductor y capa de transmisión un canal para recibir dicha muestra y ii) aplicar un potencial alterno a dicho transductor a una frecuencia y voltaje que produce resonancia e induce cavitación en dicha capa de líquido.
- 40 12. Método según la reivindicación 11, en el que la capa de transmisión tiene como espesor aproximado un múltiplo integral de media longitud de onda del sonido en su interior.
13. Método según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el transductor cilíndrico tiene un espesor de pared de aproximadamente 6,5 mm.
- 45 14. Método según la reivindicación 13, en el que el transductor cilíndrico tiene un diámetro exterior de aproximadamente 63,7 mm.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la capa de transmisión comprende acero.
- 50 16. Método según la reivindicación 15, en el que la capa de transmisión comprende un tubo cilíndrico de extensión longitudinal mayor que el transductor cilíndrico, diámetro exterior de aproximadamente 50,5 mm y espesor de pared de aproximadamente 20,5 mm.
- 55 17. Método según la reivindicación 16, en el que el canal tiene un ancho o diámetro de aproximadamente 3,8 mm.
18. Método según la reivindicación 17, en el que la frecuencia del potencial alterno varía entre 264 y 314 kHz y la magnitud del potencial es de aproximadamente $80 V_{\text{rms}}$.
- 60 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, realizado como un proceso por lotes.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, realizado como un proceso continuo.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20, que incluye enfriamiento del aparato.

65

Fig. 1.

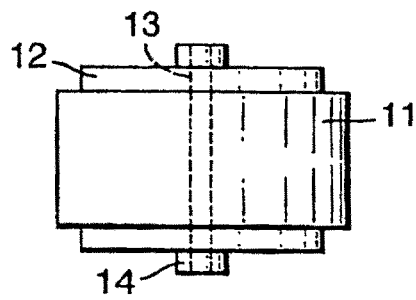


Fig.2(a)

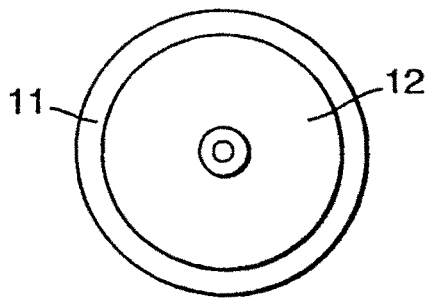


Fig.2(b)

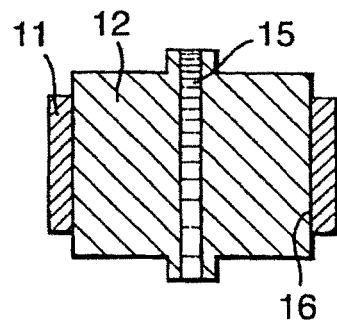


Fig.3.

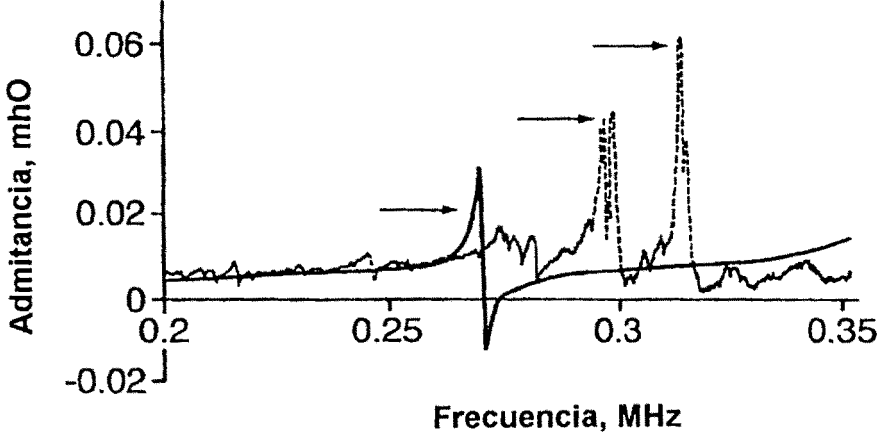


Fig.4.

