

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 667**

51 Int. Cl.:

**G01N 25/48** (2006.01)  
**G01N 33/15** (2006.01)  
**G01N 21/05** (2006.01)  
**G01N 21/552** (2014.01)  
**G01K 17/00** (2006.01)  
**B82Y 15/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027437**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14143658**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14714145 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.12.2021 EP 2972259**

54 Título: **Sistema y método para un calorímetro microfluídico**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361793545 P**

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

**09.05.2022**

73 Titular/es:

**THE CHARLES STARK DRAPER LABORATORY,  
INC. (50.0%)  
555 Technology Square  
Cambridge, MA 02139, US y  
NORTHEASTERN UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FIERING, JASON O.;  
LARSON, DALE;  
TAYLOR, AMY;  
SAADI, WAJEEH M.;  
KOWALSKI, GREGORY y  
SEN, MEHMET**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 909 667 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

Sistema y método para un calorímetro microfluídico

### Antecedentes de la comunicación

5 En general, la invención se refiere a un sistema de calorimetría microfluídica y a un método para usar un calorímetro microfluídico. Más específicamente, la invención se refiere a un sistema y método para proporcionar dos reactivos en flujo laminar microfluídico, detectar señales ópticas transmitidas a través de conjuntos de nanoagujeros en una película metálica y procesar los datos ópticos para obtener una medida calorimétrica.

10 La calorimetría es una herramienta valiosa en la investigación y el desarrollo farmacéuticos que proporciona información para la toma de decisiones en el descubrimiento y la optimización de fármacos. A diferencia de los actuales métodos de detección de alto rendimiento utilizados por la industria, como los sensores de afinidad, el análisis calorimétrico puede proporcionar información muy detallada sobre la interacción de unión entre moléculas. La calorimetría proporciona información termodinámica detallada, incluida la entalpía y la entropía de una reacción. La capacidad de medir la entalpía y determinar la entropía permite al equipo de desarrollo de fármacos evaluar las contribuciones relativas de la entalpía y la entropía a una reacción de unión. La entalpía depende del número y tipo de enlaces en la reacción de enlace. La entropía está relacionada con la geometría del ligando y el sitio de unión. 15 Comprender las contribuciones de la entalpía y la entropía es fundamental en el desarrollo de fármacos porque permite la selección de compuestos que se optimizan más fácilmente. Específicamente, las reacciones dirigidas por la entalpía tienden a verse favorecidas debido a su mayor selectividad y reactividad.

20 Con la tecnología actual, el cribado inicial de alto rendimiento y la selección del primer fármaco candidato se realizan mediante análisis de afinidad. Solo después de que el conjunto de fármacos candidatos se ha reducido a unos pocos seleccionados, los candidatos se analizan mediante las dos técnicas de calorimetría actualmente disponibles, la calorimetría diferencial de barrido y la calorimetría de titulación isotérmica, para medir las propiedades termoquímicas de una reacción. Las limitaciones de la generación actual de calorímetros incluyen:

- Sensibilidad inadecuada para reacciones con un cambio bajo en la entalpía
- 25 • Necesidad de una gran cantidad de proteína (0,5 mg a 5 mg)
- Bajo rendimiento experimental debido tanto a los largos tiempos de ejecución del experimento (60 a 90 minutos) como a la necesidad de ejecutar controles secuencialmente para evaluar la importancia de los efectos de confusión. Los posibles efectos de confusión incluyen principalmente el calentamiento debido a la mezcla de medios de muestra diferentes (tampones con diferente pH, fuerza iónica y disolventes), la presencia de DMSO del almacenamiento del compuesto y la solvatación. 30

Además, los compuestos con poca solubilidad con frecuencia dan resultados positivos en los cribados de alto rendimiento. Desafortunadamente, las concentraciones de estos compuestos necesarias para cumplir con el requisito de masa de los reactivos (proteína y su ligando) están a menudo por encima del límite de solubilidad. Como resultado de ello, no se pueden realizar estudios de calorimetría sobre las interacciones de estos compuestos con sus objetivos. 35 Paradójicamente, se requiere química médica/sintética adicional antes de que se pueda usar la calorimetría, pero este trabajo químico no puede justificarse sin los datos de la calorimetría. El resultado de esto es que no se buscan compuestos potencialmente prometedores. La capacidad de analizar cantidades más pequeñas de reactivos reduciría esta necesidad de concentración.

40 Más allá del análisis farmacéutico, la calorimetría también es valiosa en muchas ramas de la ciencia de los materiales y la química. Por ejemplo, la calorimetría es útil para las pruebas de compuestos altamente reactivos o explosivos utilizados en el diseño de procesos químicos y equipos de seguridad.

45 El documento de la patente WO2012/097221 describe un sistema de calorímetro microfluídico que incluye un aparato de calorimetría y un procesador en conexión con el aparato. El aparato incluye un canal de flujo laminar de microfluidos conectado a dos entradas para hacer fluir fluido al canal de flujo laminar. Debajo del canal de flujo laminar hay una pluralidad de sensores de temperatura a microescala en posiciones conocidas en el canal. El procesador está conectado con los sensores de temperatura discretos y determina una medida de calorimetría basada en las temperaturas locales derivadas de los datos procedentes de los sensores de temperatura a microescala y las posiciones respectivas de los sensores en el canal.

### Resumen de la comunicación

50 Por lo tanto, existe la necesidad en la industria farmacéutica de un sistema y un método para la calorimetría microfluídica. La transmisión óptica extraordinaria, un fenómeno físico relacionado con la resonancia de plasmones superficiales, se puede aprovechar para producir un aparato para determinar el cambio de temperatura de una reacción química que ocurre en el flujo laminar de microfluidos. Además de resolver las necesidades antes mencionadas de un calorímetro de este tipo, el calorímetro microfluídico descrito en este documento utiliza un flujo laminar estacionario con numerosas ventajas respecto de los métodos de calorimetría tradicionales. En primer lugar, no es necesario conocer el volumen 55

exacto de los reactivos. En segundo lugar, hacer fluir los reactivos y observar la reacción a lo largo del canal permite observar la reacción a medida que avanza, ya que los reactivos continúan difundiéndose y reaccionando a medida que fluyen. En tercer lugar, dado que las regiones de reacción y difusión son estacionarias en el espacio, lo que implica que el calor liberado en un lugar a lo largo del canal debe permanecer constante durante la prueba, los datos recopilados se pueden integrar con el tiempo para reducir el ruido y el error en los datos.

Según un aspecto de la invención, se proporciona un método para calorimetría según la reivindicación 6.

En algunas realizaciones, el método también incluye analizar partes de la medición de calorimetría, que se aproxima a una segunda medición de calorimetría realizada cuando el reactivo flúa en estado estacionario.

En algunas realizaciones, el método incluye inyectar un segundo bolo de reactivo en el primer canal de flujo a través del inyector de fluido, de modo que el segundo reactivo entre en contacto con el segundo fluido en el canal de flujo microfluídico. Luego se realiza una segunda medición de calorimetría sobre una pluralidad de concentraciones de reactivo a medida que el segundo bolo de reactivo fluye a través del canal de flujo microfluídico.

En algunas realizaciones, una reacción entre el reactivo y el segundo fluido provoca un cambio de temperatura. En ciertas realizaciones, la pluralidad de sensores a microescala son sensores de temperatura y detectan el cambio de temperatura. Los sensores de temperatura son matrices de nanoagujeros en una capa de metal dispuesta debajo del canal de flujo laminar. Las matrices de nanoagujeros están rodeadas por espejos dieléctricos. En algunas realizaciones, se dispone una capa entre la capa de metal y el canal de flujo laminar para transferir calor desde un fluido en el canal de flujo laminar a la superficie de la capa de metal.

En algunas realizaciones, al calcular una medida de calorimetría, se calcula al menos una entalpía de la reacción, una constante de enlace de la reacción, un valor de energía libre de Gibbs, un cambio en la energía libre, un valor de entropía y un cambio en la entropía.

En algunas realizaciones, el volumen del bolo de reactivo está entre aproximadamente 10 nL y aproximadamente 250 nL. El volumen del segundo fluido en el canal de flujo laminar microfluídico es entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 veces mayor que el volumen del reactivo en el canal de flujo laminar microfluídico cuando se realiza la medición calorimétrica. En algunas realizaciones, el primer fluido se selecciona de manera que no reaccione con el reactivo. En ciertas realizaciones, el método también incluye seleccionar un caudal de al menos uno del primer fluido y el segundo fluido en base a la difusividad de los fluidos.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un sistema para calorimetría según la reivindicación 1.

En algunas realizaciones, el inyector de fluidos incluye un extremo proximal acoplado a un extremo proximal de la primera entrada y un extremo distal acoplado a un extremo distal de la primera entrada. El sistema también incluye una válvula acoplada al extremo proximal del inyector de fluidos que se configura para introducir selectivamente un fluido en el inyector de fluidos para expulsar un reactivo almacenado en el inyector de fluidos en la primera entrada. El sistema incluye una segunda inyección de fluido acoplada a la segunda entrada. El inyector de fluido está configurado para contener entre aproximadamente 10 nL y aproximadamente 250 nL. En algunas realizaciones, el inyector de fluidos está configurado para contener entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 10 veces menos volumen que el canal de flujo laminar microfluídico.

La pluralidad de sensores a microescala son sensores de temperatura configurados para detectar cambios de temperatura provocados por la reacción del primer fluido y el reactivo. Los sensores de temperatura son matrices de nanoagujeros en una capa de metal dispuesta debajo del canal de flujo laminar. Las matrices de nanoagujeros están rodeadas por espejos dieléctricos. En algunas realizaciones, el sistema también incluye una capa dispuesta entre la capa de metal y el canal de flujo laminar para transferir calor desde un fluido en el canal de flujo laminar a la superficie de la capa de metal. En ciertas realizaciones, la pluralidad de sensores a microescala son sensores ópticos. Los sensores ópticos son sensores de plasmones de superficie cuya respuesta se mide por al menos un dispositivo entre un fotomultiplicador, un dispositivo de carga acoplada y un fotodiodo.

En algunas realizaciones, el sistema incluye un microscopio configurado para tomar micrografías del canal de flujo laminar de microfluidos. En algunas realizaciones, el sistema incluye una serie de sensores a microescala dispuestos a distancias específicas desde el inicio del canal de flujo laminar microfluídico.

El procesador está configurado para calcular una medida de calorimetría a partir de un conjunto de datos recopilados por la pluralidad de microsensores. La medida de calorimetría incluye calcular al menos una entalpía de la reacción, una constante de enlace de la reacción, un valor de energía libre de Gibbs, un cambio en la energía libre, un valor de entropía y un cambio en la entropía.

El procesador también está configurado para calcular una estimación de la concentración del reactivo en una pluralidad de posiciones específicas del sensor y en una pluralidad de puntos de tiempo específicos después de la inyección del reactivo. El procesador también está configurado para comparar la medición de calorimetría con una medición de calorimetría realizada en condiciones de flujo de estado estacionario, en algunas realizaciones.

En algunas realizaciones, el sistema incluye una primera y segunda bombas fluidicas controlables configuradas para hacer fluir fluido en las entradas del dispositivo. En algunas realizaciones, la velocidad a la que la segunda bomba fluidica hace fluir el segundo fluido hacia la segunda entrada se puede controlar.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 El experto en la materia comprenderá que las figuras descritas en este documento tienen únicamente fines ilustrativos. Debe entenderse que, en algunos casos, diversos aspectos de las realizaciones descritas pueden mostrarse exagerados o ampliados para facilitar la comprensión de las realizaciones descritas. En los dibujos, los caracteres de referencia similares generalmente se refieren a características similares, elementos funcionalmente similares y/o estructuralmente similares en los diversos dibujos. Los dibujos no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de las enseñanzas. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera. El sistema y el método pueden entenderse mejor a partir de la siguiente comunicación ilustrativa la cual hace referencia a los siguientes dibujos en los que:

El sistema y el método pueden entenderse mejor a partir de la siguiente comunicación ilustrativa con referencia a los siguientes dibujos en los que:

- 15 la figura 1 es un diagrama de bloques de un sistema para calorimetría microfluidica, según una realización ilustrativa de la comunicación;

la figura 2 es un modelo sólido en despiece ordenado de un aparato para uso en un sistema de calorimetría microfluidica, según una realización ilustrativa de la comunicación;

- 20 la figura 3 es un diagrama de una matriz de nanoagujeros utilizados para la transmisión óptica, según una realización ilustrativa de la comunicación;

la figura 4a es un gráfico de la transmisión óptica frente a la longitud de onda para múltiples constantes dieléctricas a través de un ejemplo de matriz de nanoagujeros;

la figura 4b es un gráfico de la transmisión óptica frente a la constante dieléctrica a través de un ejemplo de matriz de nanoagujeros;

- 25 la figura 5 es un diagrama de un canal de flujo laminar con entradas y conjuntos de nanoagujeros;

las figuras 6a, 6b y 6c son vistas en sección de un canal de flujo laminar para uso en un sistema de calorimetría microfluidica, según diversas realizaciones ilustrativas de la comunicación;

la figura 7A es un diagrama de un canal de flujo laminar con una válvula de inyección para usar en un sistema de calorimetría microfluidica, según una realización ilustrativa de la comunicación;

- 30 la figura 7B es un diagrama de la cámara de reacción del sistema de calorimetría microfluidico ilustrado en la Figura 7A, según una realización ilustrada de la comunicación;

las figuras 7C-7E son una serie de mapas de diferencia de medidas de concentración de reactivos generados utilizando un canal de flujo laminar similar al canal de flujo de la Figura 7A, según una realización ilustrativa de la comunicación;

- 35 la figura 8 es un diagrama de flujo de un método de uso del sistema de calorimetría microfluidica de la figura 1, según una realización ilustrativa de la comunicación;

la figura 9 es un diagrama de flujo para un método de procesamiento de datos ópticos recibidos del sistema de calorimetría microfluidica de la Figura 1 para obtener mediciones calorimétricas, según una realización ilustrativa de la comunicación;

la figura 10 representa una simulación de temperatura, según una realización ilustrativa de la comunicación.

- 40 la figura 11 representa gráficos que ilustran los resultados de la simulación para el coeficiente de pérdida de calor, la temperatura y las fracciones de masa en posiciones específicas a lo ancho de un canal de flujo laminar, según una realización ilustrativa de la comunicación.

la figura 12 es un gráfico que ilustra la relación entre el número de compuestos y el tiempo en un proceso de investigación y desarrollo farmacéutico;

- 45 la figura 13 es un diagrama de flujo de un método de investigación y desarrollo farmacéutico que utiliza el sistema de calorimetría microfluidica de la figura 1, según una realización ilustrativa de la comunicación.

### Descripción detallada

Para proporcionar una comprensión general de la comunicación, ahora se describirán ciertas realizaciones ilustrativas, que incluyen sistemas y métodos para calorimetría microfluidica.

La Figura 1 es un diagrama de bloques de un sistema para calorimetría microfluídica 100, según una realización ilustrativa de la comunicación. El sistema 100 se usa para detectar el cambio de temperatura y otras medidas calorimétricas de una reacción química a microescala. Un usuario ejecuta un experimento en el calorímetro de microfluidos haciendo fluir dos reactivos hacia y a través de un canal de flujo laminar, lo que hace que los reactivos reaccionen en su interfaz de difusión. Un sensor óptico detecta señales de transmisión óptica extraordinaria (EOT, por sus siglas en inglés), que se ven afectadas por el cambio de temperatura de la disolución que fluye debido a la reacción. Las señales EOT se emiten a través de nanoagujeros en una película de metal debajo de los canales de flujo laminar. Un ordenador procesa las señales EOT para obtener el cambio de temperatura y otras medidas calorimétricas.

El sistema consta de un aparato de calorimetría 102 y un procesador 140. El aparato de calorimetría 102 consta de una fuente de luz 104, un aparato desechable 106 y un aparato de montaje 108. El aparato desechable consta de un canal de flujo laminar 110, entradas 112 y una lámina de metal con nanoagujeros 114. Los dos reactivos entran al canal de flujo laminar 110 desde las entradas 112. La disposición del canal de flujo laminar y las entradas se discutirá con más detalle en relación con la figura 5. Debajo del canal de flujo laminar hay una lámina de metal 114 con una pluralidad de matrices de nanoagujeros utilizados en la detección de transmisión óptica. El calor del líquido en el canal de flujo laminar 110 directamente encima de las matrices de nanoagujeros afecta la resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés) en la lámina metálica, lo que afecta así a la transmisión de luz a través de los nanoagujeros. Los principios de la detección mediante matrices de nanoagujeros se analizan con mayor detalle en relación con las figuras 3 y 4.

El aparato desechable 106 se coloca en un aparato de montaje 108 que consta de un sensor de temperatura 120, un controlador de temperatura 122 y un sensor óptico 124. El sensor de temperatura 120 y el controlador de temperatura 122 se utilizan para mantener una temperatura del sistema lo bastante constante como para evitar que las fluctuaciones de temperatura ambientales afecten al experimento. El sensor de temperatura 120 detecta la temperatura del sistema ambiental 130 y la envía al controlador de temperatura 122. En función de la temperatura real del sistema ambiental 130, el controlador de temperatura 122 calienta o enfría el sistema, o no realiza ninguna acción si la temperatura está lo suficientemente cerca de la temperatura establecida. En una realización, se permite que la temperatura ambiental varíe en 0,0002 K, pero dependiendo de la cantidad de calor liberado por la reacción, de la precisión requerida y de la precisión del sensor de temperatura, la temperatura ambiental puede mantenerse dentro de intervalos más pequeños o mayores. La temperatura 130 también puede enviarse al procesador del sistema 140 para su uso en la calibración del aparato de calorimetría o para su uso como temperatura de referencia en el cálculo de valores calorimétricos.

El sensor óptico 124 detecta la luz emitida a través de los nanoagujeros en la lámina metálica 114. El sensor óptico 124 puede ser un fotomultiplicador, un fotodiodo, un dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés) u otro sensor de imagen, o cualquier otro aparato capaz de detectar luz con sensibilidad suficiente para distinguir matrices de nanoagujeros entre sí. El sensor óptico envía los datos ópticos recibidos a través de los nanoagujeros al procesador 140.

El aparato de calorimetría 102 también incluye una fuente de luz 104 que emite luz dirigida hacia la película de metal con nanoagujeros 114. En una realización, la fuente de luz 104 emite luz que viaja a través del canal de flujo laminar 110 y sobre la lámina de metal en un ángulo de incidencia  $\theta$ . La fuente de luz puede ser un láser de una longitud de onda única. Alternativamente, la fuente de luz puede ser una fuente de banda ancha, y se puede usar un monocromador o filtros ópticos para proporcionar un haz de luz monocromático, o se pueden usar técnicas de espectrometría en la detección.

La figura 2 es un modelo sólido en despiece 200 que muestra partes del aparato de montaje 108 y del aparato desechable 106 en un ejemplo de una realización de un sistema para calorimetría microfluídica. De izquierda a derecha, el modelo sólido 200 está representado por una cubierta de plástico 202, un cubreobjetos de vidrio 204, una celda de flujo 206, un chip de matriz de nanoagujeros 208, una bandeja de montaje 210, una unidad de calentamiento 212 y una base de plástico 214. La cubierta de plástico 202, la bandeja de montaje 210 y la base de plástico 214 soportan y protegen el aparato. Son los principales componentes estructurales del aparato de montaje 108. La celda de flujo 206, parte del aparato desechable 106, cuenta con características que comprenden las paredes del canal de flujo laminar 110 y las entradas 112. La celda de flujo 206 está moldeada a partir de una mezcla de polidimetilsiloxanos (PDMS) que aísla la celda de flujo desde la parte superior, pero puede usarse otro material aislante similar que pueda moldearse con suficiente precisión. Una impresora de objetos sólidos 3D puede fabricar un molde utilizado para crear la celda de flujo PDMS. Alternativamente, puede usarse fotolitografía para formar la celda de flujo 106. Los orificios de acceso 220, 222 y 224 permiten el acceso de los tubos a la celda de flujo. El orificio de acceso 220 brinda acceso al canal de flujo laminar 110 para que los fluidos puedan eliminarse después de fluir a través del canal de flujo, y los orificios de acceso 222 y 224 proporcionan acceso a las dos entradas para introducir reactivos en las entradas. El tubo que entra en las entradas 112 a través de los orificios de acceso 222 y 224 se conecta a un medio de control del volumen y de la velocidad de inyección en las entradas 112, tales como jeringas con bombas de jeringa. Los elementos de montaje 202, 210 y 214 pueden construirse utilizando una impresora de objetos sólidos 3D u otro método de fabricación adecuado. Después del montaje del aparato de calorimetría, la cubierta de plástico 202 y la base de plástico 214 se aprietan usando tornillos u otro elemento de sujeción, no mostrado, para mantener los elementos en contacto entre sí.

El chip de matriz de nanoagujeros 208 consta de una superficie conductora, en este caso la lámina de metal con nanoagujeros 114, encima de una superficie transparente, como un sustrato de vidrio, que también sirve como aislante. Los tipos y propiedades de los metales adecuados para su uso en los sensores de nanoagujeros y detalles adicionales

sobre el diseño y la producción de chips de matriz de nanoagujeros se analizan en el documento de la patente U.S. número 7.318.907, cuyo contenido se incorpora aquí en su totalidad. En un ejemplo de realización, se evapora primero sobre el sustrato de vidrio una capa delgada (por ejemplo, de 25 nm) de cromo u otro agente de unión metálico. Luego se evapora sobre el cromo una capa de oro más gruesa (por ejemplo, de 105 nm). Como alternativa, la lámina metálica podría estar hecha de oro, plata, aluminio, berilio, renio, osmio, potasio, rubidio, cesio, óxido de renio, óxido de wolframio, cobre, titanio u otro metal adecuado. Una vez que se han depositado los metales, las matrices de nanoagujeros se fresan en el metal utilizando, por ejemplo, técnicas fotolitográficas, técnicas litográficas de haz de electrones, un haz de iones enfocado (FIB, por sus siglas en inglés) u otros métodos. Para un FIB con una corriente de 1 pA, se necesitan 15 segundos para fresar las capas de metal. Como se representa en la figura 1, el chip de matriz de nanoagujeros 208 puede ser parte del aparato desechable. El chip de matriz de nanoagujeros 208 se puede unir al canal de flujo, o puede ser una pieza desechable separada que la bandeja de montaje 210 alinea con el aparato de montaje 108. En esta realización, los fluidos en el canal de flujo laminar 110 contactan directamente con la lámina de metal cuando el aparato está montado y bien sujeto.

La unidad de calentamiento 212 consta de un calentador termoelectrónico y de al menos un sensor de temperatura, como un termistor. Los cables 226 conectan la unidad de calentamiento 212 a un controlador de calor (no mostrado), que controla el calentador termoelectrónico en función de la temperatura de los termistores. La unidad de calentamiento 212 también puede enfriar el aparato. El sensor óptico 124, que no se muestra en la figura 2, está debajo de la base de plástico 214. La unidad de calentamiento 212 y los elementos de montaje 210 y 214 tienen orificios en el centro para que la luz que pasa a través de los nanoagujeros pueda alcanzar el sensor óptico 124 y ser medida por él. El orificio en la unidad de calentamiento no afecta sustancialmente a la regularidad de la temperatura en todo el canal de flujo laminar 110.

El aparato desechable 106 puede contener al menos un segundo canal de flujo laminar (no mostrado) que puede conectarse mediante fluidos al mismo conjunto de entradas o a una o más entradas adicionales para un diseño multiplexado que permite más de un experimento en un solo chip. Otro conjunto de matrices de nanoagujeros sobre la lámina metálica 114 o una segunda lámina metálica está debajo del segundo canal de flujo laminar. El aparato de montaje puede configurarse para ejecutar múltiples experimentos al mismo tiempo o realizar un experimento solo cada vez. Si los experimentos se van a realizar de uno en uno, el aparato de montaje puede tener un solo sensor óptico que se mueve de celda de flujo a celda de flujo a medida que se ejecutan las pruebas en cada celda de flujo. Un experimento realizado en un canal de flujo laminar en el aparato multiplexado podría diferir de un experimento realizado en un canal de flujo laminar diferente en al menos una de las siguientes condiciones: temperatura ambiental, material reactivo, material disolvente, concentración de reactivo y caudal de reactivo.

La figura 3 es un diagrama de una matriz individual 300 de diez por diez nanoagujeros. La interacción de la luz incidente de la fuente de luz y la resonancia de plasmones superficiales (SPR) excitada por la fuente de luz provoca una transmisión de luz muy eficiente a través de los nanoagujeros, llamada transmisión óptica extraordinaria (EOT). Estudios previos y resultados experimentales han demostrado que el comportamiento de la señal EOT debida a cambios en la concentración o en la temperatura depende de una variedad de parámetros de los nanoagujeros, como el diámetro de los nanoagujeros, la forma de la disposición de los nanoagujeros (por ejemplo, disposiciones rectangulares frente a circulares), el tamaño de la matriz de nanoagujeros, el posicionamiento de las matrices de nanoagujeros, etc. En esta realización, la matriz de nanoagujeros 300 está formada por 100 nanoagujeros 302 colocados en un cuadrado, pero el número y la disposición de los nanoagujeros pueden ser diferentes; por ejemplo, también se utilizan comúnmente matrices de nanoagujeros de tres por tres y de nueve por nueve. Los nanoagujeros pueden disponerse en un patrón diferente, como un patrón hexagonal, lineal o de ojo de buey. Las distancias de paso 304 y 306 entre los nanoagujeros, medidas desde el centro de un nanoagujero hasta el centro de un nanoagujero vecino, se denominan PD. La distancia de paso horizontal 304 y la distancia de paso vertical 306 son las mismas. En una realización, la distancia de paso PD es de 350 nm y el diámetro de cada nanoagujero 308 es de 150 nm (Ji et al., 2008). La elección de 150 nm se decide por la fácil fabricación de orificios relativamente grandes utilizando la técnica de haz de iones enfocados (FIB) y la litografía por haz de electrones (Ji et al., 2008). El diámetro del orificio puede oscilar entre 130 nm y 290 nm, o se pueden usar orificios más pequeños. La distancia de paso depende de la longitud de onda de la luz incidente, del patrón geométrico de los nanoagujeros y de las constantes dieléctricas de la película metálica y del disolvente sobre la película metálica. La distancia de paso puede variar entre 220 nm y 540 nm. El paso es una función de la longitud de onda de la luz que se usa y del patrón geométrico que se usa.

Cada matriz de nanoagujeros 300 puede estar rodeada por espejos dieléctricos, tales como campos de espejos de Bragg, para reflejar y confinar la energía del plasmón superficial asociada con un pico de transmisión de la matriz de nanoagujeros. Esto crea efectos de interferencia tanto constructivos como destructivos, aumentando o disminuyendo así la transmisión en ciertas longitudes de onda. El uso de espejos de Bragg para aplicaciones de detección de nanoagujeros se analiza con mayor detalle en Lindquist et al. (2009), cuyo contenido se incorpora aquí en su totalidad.

El porcentaje de luz transmitida en la transmisión EOT se ve afectado por la longitud de onda de la luz incidente, como se muestra en la Figura 4a, que muestra el porcentaje de transmisión frente a la longitud de onda para múltiples constantes dieléctricas de fluidos (Krishnan, A. et al. 2001). Para una capa particular de fluido dieléctrico con constante dieléctrica  $\epsilon_1$  y una lámina de metal con constante dieléctrica  $\epsilon_2$ , luz con ángulo de incidencia  $\theta$ , lámina metálica con constante de red  $a_0$ , y una constante  $\gamma$ , el pico de la longitud de onda de resonancia es el siguiente:

$$\lambda_{pico} = \frac{a_0}{\gamma} \left[ \left( \frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2} \right)^{1/2} - \text{sen}(\theta) \right]$$

Ecuación 1

5 La ecuación 1 indica que un cambio en la longitud de onda de resonancia en un pico se basa en el cambio en la constante dieléctrica de la capa de fluido dieléctrico, ya que todas las demás variables son constantes durante una reacción química observada en el sistema de calorimetría. El cambio en la constante dieléctrica depende de los cambios de temperatura, presión y concentración de un material. Relacionando la constante dieléctrica con los cambios de temperatura y presión, manteniendo constante la concentración y definiendo:

$$\Phi = \frac{\rho}{\rho_0} = \exp(-[\beta(T - T_0) - k_T(P - P_0)])$$

10 donde  $\rho$  es la densidad,  $T$  es la temperatura,  $\beta$  el coeficiente de expansión volumétrica,  $T$  es la temperatura,  $k_T$  es el factor de compresibilidad isotérmica, y  $P$  es la presión, se obtiene:

$$\lambda_{pico} = \frac{a_0}{\gamma} \left( \frac{\epsilon_2 \left[ \frac{1+2C_0\rho_0\Phi}{1-C_0\rho_0\Phi} \right]}{\frac{1+2C_0\rho_0\Phi}{1-C_0\rho_0\Phi} + \epsilon_2} - \text{sen}(\theta) \right)$$

Ecuación 2

donde la concentración constante  $C$  es:

$$\left[ \frac{n_0^2 - 1}{n_0^2 + 2} \right] \frac{1}{\rho_0}$$

15 Los valores de referencia de las condiciones de temperatura y presión están representados por  $n_0$  y  $P_0$ . Como se muestra en la figura 4a, los resultados experimentales muestran que a medida que la constante dieléctrica  $\epsilon_2$  del fluido cambia, tanto la longitud de onda pico como el porcentaje de transmisión a la longitud de onda pico, cambian. Además, para una longitud de onda dada, el porcentaje de transmisión, que es medido por el sensor óptico 124, cambia a medida que cambia la constante dieléctrica del fluido.

20 Esto se muestra más claramente en la figura 4b, un gráfico que muestra el porcentaje de luz incidente transmitida a través de una matriz de nanoagujeros de sublongitud de onda frente a la constante dieléctrica del material adyacente a los nanoagujeros (Krishnan, A. et al. 2001). Dado que la constante dieléctrica depende de la temperatura, de la presión y de la concentración del material, se puede utilizar un sensor EOT como sensor de temperatura.

25 La figura 5 es un diagrama del canal de flujo laminar 110 y de las entradas 112 con conjuntos de nanoagujeros 502 y 504. El flujo está completamente desarrollado en el canal y está en estado estacionario, lo cual no está de acuerdo con la invención. La entrada izquierda contiene un primer reactivo 506, que se muestra mediante el rayado oscuro. La entrada derecha contiene un segundo reactivo 508, que se muestra en blanco. Para un ejemplo de prueba farmacéutica, el fluido que fluye a través de una entrada contiene un fármaco y el fluido que fluye a través de la otra entrada incluye una proteína a la que el fármaco principal no puede unirse. Se pueden usar otros tipos de reactivos para otros tipos de estudios de calorimetría. La región con el rayado más claro 510 muestra la zona de difusión en la interfaz de los dos reactivos entre los que se produce la reacción. La forma de esta región de difusión dependerá de las velocidades de flujo de los reactivos y la difusividad de los fluidos; los reactivos más difusivos tendrán una región de difusión más amplia que los reactivos menos difusivos. Los reactivos pueden recibir dos caudales diferentes para controlar la forma o posición de la región. Un intervalo aceptable del caudal en el canal es de 0,0005 m/s a 0,05 m/s, o de 0,15  $\mu\text{l}/\text{min}$  a 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Aunque, a modo de ilustración, las entradas de la Figura 5 se muestran entrando en el canal de flujo laminar en ángulo, es preferible que antes de entrar en el canal de flujo laminar sean sustancialmente paralelas entre sí y estén en línea con el canal de flujo laminar para que los fluidos no tengan velocidad en el eje  $x$  al entrar en el flujo laminar.

35 La región de difusión 510 es estacionaria a lo largo del tiempo, lo que proporciona varias ventajas clave sobre los métodos de calorimetría tradicionales. A medida que se añade volumen de reactivo al canal, los reactivos continúan fluyendo a través del canal, de modo que en un nanoagujero dado debajo de la región de difusión 510, el fluido sobre él tiene una concentración y un calor de reacción sustancialmente similares durante la prueba. Esto permite que un observador integre los datos a lo largo del tiempo, reduciendo el ruido y el error en las mediciones. Además, dado que la región de difusión se extiende a lo largo de todo el canal, se observan simultáneamente múltiples etapas de la reacción, lo que permite observaciones detalladas sobre cómo progresa la reacción con el tiempo. Además, dado que la relación entre el reactivo izquierdo y el reactivo derecho varía a lo ancho de la región de difusión, los nanoagujeros

a lo ancho del canal observan la reacción con concentraciones relativas variables de reactivos.

El ancho del canal de flujo laminar 512, denominado  $w$ , y la longitud del canal 514, denominada  $l$ , no están a escala, ya que la longitud  $l$  suele ser mucho mayor que la anchura  $w$ . En una realización,  $w$  es de 500  $\mu\text{m}$  y la longitud es de 5000  $\mu\text{m}$  para proporcionar un área superficial suficientemente grande como para observar una interdifusión sustancial de reactivos y la generación de productos de reacción. De manera más general, el ancho podría estar típicamente en el intervalo de 50 a 1000  $\mu\text{m}$ , y la longitud podría estar en el intervalo de aproximadamente 500 a 10000  $\mu\text{m}$ . El ancho y la longitud del canal están limitados en cuanto a su límite superior por el volumen de reactivo consumido deseado y por la necesidad de mantener el flujo laminar, y en cuanto a su límite inferior por la separación mínima de las matrices de nanoagujeros y la resolución deseada de las matrices de nanoagujeros, es decir, el número de sensores de matriz de nanoagujeros. La altura del canal de flujo laminar, en una realización, es de 10  $\mu\text{m}$ , pero normalmente puede estar en el intervalo de 1 a 30  $\mu\text{m}$ . Una altura más pequeña reducirá el volumen de reactivo consumido y puede mejorar la precisión y la sensibilidad, ya que se minimizarán las variaciones de temperatura a lo largo de la altura del canal. Sin embargo, consideraciones prácticas como las tolerancias de fabricación y la presión de entrada pueden establecer un límite inferior en la altura del canal. Los volúmenes de reactivo consumidos están determinados por el volumen geométrico interno del canal de flujo laminar. El volumen de reactivo de cada uno de los dos componentes será al menos igual a la mitad del producto de la longitud, la anchura y la altura de este canal. En la práctica, normalmente se necesitará de 2 a 10 veces este producto para estabilizar el flujo y realizar una medición. Otras consideraciones al diseñar el canal de flujo laminar son las velocidades de flujo necesarias para el flujo laminar y la difusividad de los reactivos. El ancho y la longitud del canal variarán dependiendo al menos de estas características. Las matrices de nanoagujeros 502 están uniformemente espaciadas horizontalmente por la distancia 512, denominada  $a$ , y verticalmente por una distancia 518, denominada  $b$ . En la figura,  $a$  y  $b$  se muestran iguales, pero no es necesario que lo sean. Además, las matrices de nanoagujeros 502 no necesitan estar igualmente espaciadas en todo el canal de flujo laminar 110. Por ejemplo, en la dirección horizontal, las matrices de nanoagujeros 502 pueden estar más concentradas cerca del centro del canal donde reaccionan los reactivos. En la dirección vertical, las matrices de nanoagujeros 502 pueden concentrarse cerca de las entradas 112 donde los reactivos comienzan a reaccionar. Si bien es importante colocar conjuntos de nanoagujeros 502 cerca de la reacción para capturar el cambio de temperatura, también puede ser útil colocar conjuntos de nanoagujeros 502 cerca de los bordes del canal de flujo laminar 110 para tomar medidas de referencia de los fluidos cuya temperatura no se ha visto afectada por la reacción. De manera similar, puede ser útil colocar matrices de nanoagujeros 504 u otros tipos de sensores de temperatura o concentración en las entradas 112 para tomar medidas de referencia de los reactivos antes de cualquier reacción o difusión. Un método para determinar la separación de los nanoagujeros 502 en el canal de flujo laminar se analiza con más detalle en relación con la figura 10.

La figura 6 muestra varias vistas en sección de canales de flujo laminar para calorimetría microfluídica. La figura 6a muestra el canal de flujo laminar 600 formado por el canal de PDMS 604, la lámina metálica 606 con nanoagujeros 614, el sustrato de vidrio 608, la unidad de calentamiento 610 y el sensor óptico 612. Los reactivos viajan a través del rectángulo delimitado por el canal de PDMS 604 y la lámina metálica 606. La luz incidente 602 viaja hacia el interior del canal a través de la capa de PDMS 604, incidiendo en la hoja de metal 606. Esto excita los plasmones de superficie en la parte superior de la lámina de metal, que interactúan con la luz creando la EOT 616 que viaja a través del sustrato de vidrio 608 y va hacia el sensor óptico 612. Como se mencionó anteriormente, el sensor óptico puede ser un fotomultiplicador, un fotodiodo, un dispositivo de carga acoplada (CCD) u otro sensor de imagen, o cualquier otro aparato capaz de detectar luz con resolución suficiente para distinguir matrices de nanoagujeros entre sí. La unidad de calentamiento 610, similar a la unidad de calentamiento 212, nuevamente no interfiere con la EOT 616. Los elementos del canal de flujo laminar y los otros equipos no están a escala.

La figura 6b es similar a la figura 6a, pero incluye una ventana óptica 638 en la parte superior del canal de flujo laminar. Esto permite observar la reacción desde arriba. También permite que los lados del canal de flujo laminar se construyan con un material, como un silicato, que de lo contrario interferiría con la fuente de luz, ya que la fuente de luz viajaría a través de la ventana óptica en lugar de a través del material que interfiere. El acceso a materiales alternativos para fabricar el canal de flujo permite una mayor precisión de diseño y, por lo tanto, un volumen de canal de flujo laminar más pequeño con más opciones de materiales.

La figura 6c también es similar a la figura 6a, pero en este caso, el canal de flujo laminar 660 también incluye una capa de transferencia de calor dieléctrica 658 dispuesta encima de la lámina metálica 646 y debajo del canal de PDMS 644. Como las matrices de nanoagujeros solo pueden detectar cambios de temperatura a una distancia muy pequeña por encima de su superficie, por ejemplo 100 nm, el calor de la reacción debe transportarse a través de la capa de transferencia de calor 658, o bien la capa de transferencia de calor debe ser muy delgada. Si el sustrato de vidrio recubierto con la lámina metálica se va a reutilizar para más de una prueba de calorimetría, la capa de transferencia de calor 658 sería parte del aparato desechable 106 de la Figura 1 para proteger la lámina metálica reutilizable de los reactivos y la reacción. La capa 658 puede estar compuesta, por ejemplo, de dióxido de silicio depositado en fase de vapor, de nitruro de silicio o de polímeros depositados en fase de vapor o mediante revestimiento por centrifugación tales como PDMS, acrílico o policarbonato.

La figura 7A muestra un canal de flujo laminar. El canal de flujo laminar 700 incluye una parte aguas abajo, denominada cámara de reacción 715, un primer puerto de entrada de fluido 701, un puerto de entrada de tampón 702 y un puerto de salida 716. El canal de flujo laminar 700 también incluye un puerto de entrada de reactivo 703, a través del cual se puede inyectar un bolo del reactivo en un depósito de reactivo 705. El canal de flujo laminar 700 también incluye una

serie de válvulas 706, 708, 709, 710 y 711. Para llenar el depósito de reactivo 705, el dispositivo se ceba con un fluido como el líquido tampón. Una vez cebadas, las válvulas 706, 708 y 711 se cierran. Se abren las válvulas 709 y 710 y se bombea un bolo del reactivo al depósito de reactivo 705 desde el puerto de entrada de reactivo 703. A medida que el bolo de reactivo entra en el depósito de reactivo 705, el volumen del bolo desplaza una parte del fluido de cebado en el depósito de reactivo 705. El exceso de fluido de cebado sale a través del puerto de salida 712. Como en la figura 5, la forma de esta región de difusión dependerá de los caudales de los reactivos y de la difusividad de los fluidos. En algunas realizaciones, la solución tampón y/o cebadora puede ser cualquier tampón acuoso adecuado, preferiblemente un tampón ópticamente transparente con propiedades dieléctricas sensibles a la temperatura.

Durante un experimento, el primer fluido y el fluido tampón se introducen en el dispositivo desde los puertos de entrada 701 y 702, respectivamente. Se pueden tomar medidas de referencia y/o realizar calibraciones mientras fluye el fluido tampón, que no reacciona con el primer fluido. Después de inicializar un flujo laminar, la válvula 706 se cierra y las válvulas 708 y 711 se abren. A medida que el fluido tampón fluye a través del depósito de reactivo 705 (también denominado inyector de fluido), el bolo de reactivo se inyecta en la cámara de reacción 715. La inyección del bolo en la cámara de reacción 715 se describe con más detalle en relación con la Figura 7B. El dispositivo minimiza la cantidad de reactivo utilizado en un experimento inyectando solo un bolo del reactivo en lugar de hacer fluir el reactivo a través de la cámara de reacción 715 a niveles de flujo de estado estacionario. Esto es especialmente beneficioso si el reactivo es escaso o caro. En algunas realizaciones, el volumen del bolo de reactivo está entre aproximadamente 5 nL y aproximadamente 300 nL, aproximadamente 10 nL y aproximadamente 250 nL, aproximadamente 10 nL y aproximadamente 200 nL, aproximadamente 10 nL y aproximadamente 150 nL, aproximadamente 10 nL y aproximadamente 100 nL, o aproximadamente 10 nL y aproximadamente 50 nL. En algunas realizaciones, el depósito de fluido 705 está configurado para contener entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 10, aproximadamente 1,25 y aproximadamente 7, o aproximadamente 2 y aproximadamente 5 veces menos volumen que la cámara de reacción 715. En una realización, el reactivo es una disolución de proteína, y la entrada derecha contiene un fármaco, pero se pueden utilizar otros reactivos para otras aplicaciones, como estudios enzimológicos, de combustión, sistemas de control, circuitos de compensación de temperatura y estudio de explosivos. En otra realización, la disolución tampón se inyecta desde el primer puerto de entrada de fluido 701 y el puerto de entrada de tampón 702. En algunas realizaciones, el dispositivo puede incluir más de un depósito de reactivo 705 para la inyección de reactivos en el fluido. En algunas realizaciones, un depósito de reactivo 705 y los puertos y válvulas de entrada y salida que lo acompañan están acoplados al canal de flujo conectado al primer puerto de fluido 701. En algunas realizaciones, los canales de flujo del dispositivo tienen entre aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  de ancho y entre unos 15  $\mu\text{m}$  y unos 50  $\mu\text{m}$  de alto. En algunas realizaciones, la longitud de la cámara de reacción 715 está entre aproximadamente 3 mm y aproximadamente 10 mm.

En algunas realizaciones, inyectar el bolo y/o abrir y cerrar las válvulas no interrumpe la presión del fluido en el canal de flujo laminar, lo que puede alterar el flujo laminar. Incluso después de que se haya liberado el reactivo, el flujo continúa a través de la vía de la válvula de inyección para que no se altere la presión del fluido detrás del reactivo.

En esta realización, el reactivo puede mezclarse con la disolución tampón cuando sale de la válvula. La válvula 706 puede permanecer ligeramente abierta cuando se inyecta el bolo para permitir que el tampón de la entrada de tampón 702 se mezcle con el reactivo a medida que sale del depósito de reactivo 705. En este caso, los nanoagujeros se pueden usar para medir las señales EOT de la disolución de reactivo y determinar su concentración.

Se pueden usar bombas en un sistema de inyección para regular el flujo; por ejemplo, pueden usarse sistemas de inyección electrocinética y sistemas de inyección peristáltica, o cualquier otro sistema de inyección a microescala, tal como el sistema de flujo de inyección descrito en Leach, et al. (2003), cuyo contenido se incorpora aquí en su totalidad. En una realización multiplexada, se colocan múltiples válvulas de inyección en una única entrada para que se puedan ejecutar múltiples pruebas a través del mismo canal de flujo laminar.

En algunas realizaciones, se puede inyectar y estudiar un bolo de reactivo a distancias específicas en el canal de flujo laminar 700 desde la conexión en Y 713. Por ejemplo, se puede inyectar un bolo de reactivo 708 y luego medirse a distancias de aproximadamente 0,10 mm a aproximadamente 0,15 mm, de aproximadamente 1,50 mm a aproximadamente 1,60 mm, o de aproximadamente 3,0 mm a aproximadamente 3,2 mm de la conexión en Y 713.

En algunas realizaciones, la pequeña escala del bolo y las faltas de uniformidad del bolo influyen significativamente en los resultados de las pruebas. En algunas realizaciones, los efectos de la dispersión, el perfil del bolo y otras faltas de uniformidad que pueden afectar el resultado experimental se tienen en cuenta al comparar el perfil de concentración en el bolo con el perfil de concentración del mismo reactivo en flujo continuo en estado estacionario. En algunas realizaciones, un usuario puede crear un perfil de concentración único del reactivo bajo flujo de estado estacionario y luego usar el perfil de concentración en experimentos de bolos posteriores. En ciertas realizaciones, esto puede ahorrar reactivo en los experimentos posteriores.

En ciertas realizaciones, un perfil de concentración de bolo se compara con un perfil de concentración de estado estacionario para determinar las regiones del perfil de concentración de bolo que se aproximan al perfil de concentración del estado estacionario. En otras realizaciones, el perfil de concentración del bolo no se compara directamente con los perfiles de concentración en estado estacionario. Más bien, los detalles sobre el perfil de concentración del bolo se estiman en respuesta a la dinámica de flujo conocida del canal de flujo laminar 700.

La figura 7B ilustra la conexión en Y 713 de la figura 7A con mayor detalle. Como se describió anteriormente, el primer fluido entra en la cámara de reacción 715 desde el canal 721, que está acoplado a la entrada 701. El bolo 720 es transportado por el fluido tampón y entra en la cámara de reacción 715 desde el canal 722. La reacción entre el bolo 720 y el primer fluido se mide en la interfaz de flujo laminar 723 entre las corrientes de los canales 721 y 722. En algunas realizaciones, en la interfaz de flujo laminar 723 la reacción entre el bolo 720 y el primer fluido es comparable a un perfil de concentración de estado estacionario entre el bolo y el primer líquido en estado estacionario.

Las figuras 7C-7E son una serie de mapas de diferencias que comparan el perfil de concentración del bolo con un perfil de concentración en estado estacionario. Generado a partir de un experimento en el que se inyectó un bolo de 50 nl de fluoresceína en un canal de flujo laminar con una válvula inyectora similar al canal de flujo laminar 700 descrito anteriormente. La figura 7C es un mapa de diferencias que compara el perfil de concentración del bolo con el perfil de concentración en estado estacionario cuando el bolo había viajado 0,11 mm por el canal de flujo laminar. La figura 7D es un mapa de diferencias que compara el perfil de concentración del bolo con el perfil de concentración en estado estacionario cuando el bolo había viajado 1,54 mm por el canal de flujo laminar, y la figura 7E es un mapa de diferencias que compara el perfil de concentración del bolo con el perfil de concentración en estado estacionario cuando el bolo había viajado 3,09 mm por el canal de flujo laminar. En este experimento, los mapas de diferencias ilustran la diferencia porcentual entre el perfil de concentración del bolo y el perfil de concentración en estado estacionario. La figura 7C también incluye un cuadro en línea discontinua que marca la región del mapa de diferencias en la que el perfil de concentración del bolo se aproxima al perfil de concentración en estado estacionario. Además, como cada perfil de concentración ilustra la evolución del bolo, la longitud de la región del mapa de diferencias en la que el bolo se aproxima al estado estacionario proporciona una aproximación de la medida del tiempo de la reacción.

En algunas realizaciones, la distribución de la concentración del bolo se puede predecir en el tiempo y el espacio a partir de cálculos teóricos y/o simulaciones, y esta información se puede usar para inferir la concentración del reactivo en cualquier momento temporal después de la inyección en la entrada 716 y en el canal de flujo 700. La concentración predicha se puede usar junto con las mediciones de temperatura para calcular una cantidad calorimétrica

En algunas realizaciones, el perfil de concentración del bolo cambia a medida que el bolo fluye por el canal de flujo laminar 700. El bolo puede interdifundirse con los otros fluidos en el canal de flujo laminar 700 y, si el canal de flujo laminar 700 es lo suficientemente largo, crear una mezcla fluida homogénea. A medida que el bolo se interdifunde con los fluidos que lo rodean, la concentración relativa del reactivo en el bolo disminuye. Usando este principio, en algunas realizaciones, se inyecta un solo bolo en el canal de flujo laminar 700 y se usa para estudiar la reacción química a una pluralidad de concentraciones de reactivo con un fluido de prueba. Por ejemplo, se puede inyectar un bolo del reactivo 708 en el canal de flujo laminar 700 a un nivel de concentración relativamente alto. A medida que el bolo fluye a través del canal de flujo laminar 700, reacciona químicamente y/o se interdifunde con los fluidos circundantes dando como resultado una concentración del bolo que disminuye continuamente respecto de la concentración inicial. En algunas realizaciones, un experimento estilo bolo único, como se describe aquí, puede reemplazar una pluralidad de experimentos realizados a un flujo estacionario y cada uno con una concentración de reactivo diferente, reduciendo así la cantidad de reactivo requerida para generar los mismos datos.

En algunas realizaciones, la extensión o dispersión longitudinal del bolo a medida que el bolo avanza a lo largo de toda la cámara de reacción 715 se modela matemáticamente. En algunas realizaciones, se usa la teoría de dispersión hidrodinámica de Taylor-Aris para predecir la distribución de masa del bolo a medida que fluye a lo largo de la cámara de reacción 715. El cálculo de la dispersión del bolo permite, dada la altura y el ancho del canal, el cálculo de la concentración media en una posición aguas abajo del canal en función del tiempo. En algunas realizaciones, se supone que la cámara de reacción 715 es lo suficientemente poco profunda para permitir que la concentración del bolo sea uniforme a lo largo de la altura de la cámara de reacción 715 en una posición determinada. En este enfoque, se define un número de Peclet  $Pe(x) = v(x)h/D$  de tal manera que varía a lo largo del ancho del canal de acuerdo con la velocidad  $v(x)$  del flujo de fluido. El número de Peclet se utiliza para calcular el coeficiente de difusión:

$$D_{eff}(x) = D \left( 1 + \frac{1}{210} Pe(x)^2 \right)$$

Ecuación 3

La concentración promedio del bolo se puede calcular mediante:

$$c(z, t) = \frac{1}{2w} \int_{-\frac{w}{2}}^{\frac{w}{2}} \left( 1 + \operatorname{erf} \left( \frac{z - z_0 - v(x)t}{2\sqrt{D_{eff}(x)t}} \right) \right) dx$$

Ecuación 4

En la ecuación anterior, se supone que la altura del canal es uniforme y la concentración inicial del bolo se normaliza a la unidad. La posición  $z_0$  es la ubicación del paso de concentración en  $t=0$  y erf es la función de error.

La figura 8 es un diagrama de flujo para un método de uso de un calorímetro microfluidico, especialmente el calorímetro de la figura 1. Primero, se preparan el aparato y los reactivos (Paso 802). Esto puede incluir poner reactivos en válvulas de inyección, como se explica en relación con la figura 7, y preparar más fluidos tampón. Los reactivos pueden disolverse o mezclarse con un disolvente. En este caso, el calor de la reacción química provocará un cambio de temperatura detectable en el fluido. La preparación del aparato incluye el montaje del aparato de calorimetría, por ejemplo, insertar el aparato desechable que incluye al menos las entradas y la celda de flujo laminar en el equipo de montaje para que el sensor óptico, los nanoagujeros y el canal de flujo laminar estén correctamente alineados, con la unidad de calentamiento en su lugar y sin interrumpir el camino de la luz. Según corresponda, la preparación también incluye alinear la fuente de luz para que se dirija a los nanoagujeros y, si entra al canal de flujo laminar desde arriba, se conoce el ángulo de incidencia. Se conecta cualquier tubería a fuentes de fluido externas o válvulas de inyección. Finalmente, se conecta el cableado a un controlador de calor externo y a un ordenador para recibir y procesar los datos según sea necesario.

A continuación, los reactivos fluyen a través del canal de microfluidos (paso 804). Los caudales se seleccionan antes de comenzar la prueba y son controlados por el sistema de inyección, que incluye el mecanismo de inyección de la solución tampón y las válvulas de inyección. Alternativamente, los caudales se pueden ajustar y/o se pueden realizar otras calibraciones a medida que la solución tampón pasa a través del canal de flujo laminar. Si ambas entradas están conectadas a válvulas de inyección que inyectan la muestra después de la inicialización con una solución tampón, la liberación de los reactivos de las válvulas de inyección debe controlarse cuidadosamente para que ambos reactivos ocupen el canal de flujo laminar de forma simultánea.

Una vez que los fluidos fluyen hacia el canal de flujo laminar, el sensor óptico detecta la salida de luz a través de los nanoagujeros y envía los datos a un ordenador procesador conectado (paso 806). El ordenador procesador procesa entonces al menos los datos de emisión de luz para determinar una medida calorimétrica de la reacción (paso 808). El procesamiento de datos para determinar las medidas calorimétricas se analiza en relación con la figura 9.

La figura 9 es un diagrama de flujo de un método de procesamiento de datos ópticos para obtener medidas calorimétricas. El ordenador recibe datos ópticos 906 del sensor óptico. Además, el ordenador tiene en la memoria o recibe información de las ubicaciones de los sensores ópticos 910 situados a lo largo del canal. Los datos del sensor óptico dependen tanto de la concentración como de la temperatura según la relación  $D = TC + \text{Error}$ , donde D es una matriz de los datos ópticos en el espacio, T es la matriz de temperatura, para la que se realiza convolución con la matriz de concentración C, y el término de error es ruido de medición experimental. La resolución de curvas multivariantes mediante mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS, por sus siglas en inglés) es una técnica de deconvolución que se puede utilizar para calcular iterativamente la concentración y la temperatura que se ajusten mejor a los datos experimentales dentro de las restricciones dadas, tales como no negatividad, cierre u otras restricciones de modelado duro. Pueden usarse otros métodos de deconvolución iterativos o no iterativos adecuados. Dado que los datos ópticos dependen tanto de la concentración como de la temperatura del fluido, la información sobre la concentración química 908 se conoce preferiblemente con el fin de determinar la temperatura del fluido en las ubicaciones de la matriz de nanosensores a partir de los datos ópticos (paso 902). Dado que los reactivos están en flujo laminar experimentando difusión, las propiedades conocidas de transporte de masa de los reactivos pueden usarse para determinar una estimación inicial de la concentración utilizada como en el algoritmo de deconvolución para determinar la temperatura. Además, las matrices de nanoagujeros en el canal de flujo laminar o en las entradas se pueden usar como sensores de concentración química en lugares donde se conoce la temperatura. Alternativamente, se pueden colocar otros tipos de sensores de concentración química a lo largo del canal de flujo laminar o en las entradas para medir directamente la concentración. Dado que la región de difusión es estacionaria en el espacio, el mapa de temperatura y los datos ópticos deberían ser estacionarios en el tiempo. Por lo tanto, para reducir el término de ruido, los datos pueden integrarse a lo largo del tiempo.

Una vez que se han determinado las temperaturas locales, se pueden calcular otras medidas calorimétricas (paso 904). Las direcciones x y z se muestran en la figura 5 en la intersección inicial de los fluidos 504 y 506. El origen (x=0; y=0; z=0) es donde el borde derecho de la entrada derecha se encuentra con el canal de flujo laminar en el plano de la parte superior de la lámina de metal. Las direcciones x e y se muestran en la figura 6A. La formulación de la ecuación de energía en el canal es la siguiente, donde  $\rho$  es la densidad del fluido, c es el calor específico del fluido,  $V_z$  es la velocidad a lo largo del canal en la dirección z, T es la temperatura, k es la conductividad térmica de la disolución que fluye en el canal y q es el calor liberado o absorbido debido a la reacción:

$$\rho c V_z \frac{\partial T}{\partial z} = k \left( \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \right) + \dot{q}(x, y, z)$$

Ecuación 5

Integrando en la dirección y sobre una profundidad de canal d (de  $y = 0$  a  $Y = d$ ) y definiendo  $T = 1/d \int T dy$  se obtiene:

$$\rho c V_z d \frac{\partial \bar{T}}{\partial z} = kd \left( \frac{\partial^2 \bar{T}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \bar{T}}{\partial z^2} \right) + k \int_{y=0}^{y=d} \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} dy + \dot{q}(x, y, z)d$$

Ecuación 6

$$k \int_{y=0}^{y=d} \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} dy = k \left. \frac{\partial T}{\partial y} \right|_{y=d} - k \left. \frac{\partial T}{\partial y} \right|_{y=0} = -q''_{y=d} + q''_{y=0}$$

Ecuación 7

Los resultados experimentales muestran que  $q''_{y=0} \gg q''_{y=d}$ , por lo tanto, la pérdida en el lado del PDMS puede ser insignificante. Luego, integrando en la dirección x, de  $x = 0$  a  $x = w$ , se obtiene lo siguiente:

$$\begin{aligned} & w\rho cV_z d \frac{\partial \bar{T}}{\partial z} \\ &= kwd \frac{\partial^2 \bar{T}}{\partial z^2} + kd \int_{x=0}^{x=w} \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} dx + \int_{x=0}^{x=w} q''_{y=0}(x, z) dx + d \int_{x=0}^{x=w} \dot{q}(z) dx \end{aligned}$$

Ecuación 8

La transferencia de calor en la dirección x en el límite es adiabática, por lo que:

$$k \int_{x=0}^{x=w} \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} dx = k \left. \frac{\partial T}{\partial x} \right|_{x=w} - k \left. \frac{\partial T}{\partial x} \right|_{x=0} = 0$$

Ecuación 9

$$wd \rho cV_z \frac{\partial \bar{T}}{\partial z} = kwd \frac{\partial^2 \bar{T}}{\partial z^2} + \int_{x=0}^{x=w} q''_{y=0}(x, z) dx + d \int_{x=0}^{x=w} \dot{q}(z) dx$$

Ecuación 10

$$d \int_{x=0}^{x=w} \dot{q}(z) dx = wd \rho cV_z \frac{\partial \bar{T}}{\partial z} - kwd \frac{\partial^2 \bar{T}}{\partial z^2} - \int_{x=0}^{x=w} q''_{y=0}(x, z) dx$$

Ecuación 11

donde  $q(z)$  es la fuente de calor local debido a la reacción química promediada sobre el ancho del canal x y la profundidad y. Aquí, la temperatura T también se promedia sobre el ancho del canal x.  $q''_{y=0}$  representa el flujo de calor proveniente de la superficie del chip y se puede aproximar mediante:

$$q''_{y=0} = H(x, z) [\bar{T}_{\text{chip}} - \bar{T}(z)]$$

Ecuación 12

donde  $H(x, z)$  es el coeficiente de pérdida de calor de calibración determinado experimentalmente para el sistema. A lo largo de la dirección del flujo, entre las ubicaciones Z1 y Z2, la fuente de calor total se puede obtener integrando la fuente de calor local a lo largo de la dirección z. Poniendo  $f = T$  y reordenando se obtiene la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} & d \int_{z_1}^{z_2} \int_{x=0}^{x=w} \dot{q}(z) dx dz \\ &= wd \rho cV_z [T(z_2) - T(z_1)] - wd \left[ k \left. \frac{\partial T}{\partial z} \right|_{z_2} - k \left. \frac{\partial T}{\partial z} \right|_{z_1} \right] \\ & - \int_{z_1}^{z_2} \int_{x=0}^{x=w} H(x, z) [T_{\text{chip}} - T(x, z)] dx dz \end{aligned}$$

Ecuación 13

En este enfoque analítico, que usa la forma general de la ecuación de la energía, se mantiene el énfasis en el término fuente de calor y se han realizado las simplificaciones necesarias con base en los resultados numéricos anteriores. La ecuación 11 muestra que la entalpía de reacción ( $\Delta H=q/h_{AB}$ ) se puede extraer en función de las mediciones de temperatura del campo de flujo para esta configuración experimental. A partir de la entalpía de reacción y la temperatura, se pueden calcular medidas calorimétricas adicionales, como la constante de enlace de la reacción, la energía libre de Gibbs, el cambio de energía libre, la entropía y el cambio de entropía en función de la temperatura.

Por ejemplo, la constante de enlace  $K_D$  se puede obtener usando los perfiles de temperatura en los balances de energía usando volúmenes acotados por  $X_1, X_2, Z_1, Z_2$  y la altura del canal para determinar la fuente de calor  $q$  debido a la reacción en ese volumen. La repetición de este cálculo para varios volúmenes,  $X_2, X_3, Z_1, Z_2; X_3, X_4, Z_1, Z_2 \dots X_n, X_{n+1}, Z_1, Z_2$ , proporcionará información sobre la energía liberada para diferentes cantidades de reactivo y productos. La fuente de calor medida debido a la reacción en cada volumen está relacionada con la entalpía de reacción y la constante de enlace. Esta información se usa en una definición combinada de balance de masa y constante de enlace, a continuación, para determinar iterativamente la constante de enlace usando la fuente de calor medida debido a la reacción en los diferentes volúmenes:

$$(n_{ML})^2 - [N_i \Delta n_L + n_{MTOT} + K_D] + (N_i \Delta n_L) n_{MTOT} = 0$$

Para obtener mediciones entálpicas precisas, las matrices de nanoagujeros deben proporcionar una resolución de medición adecuada sin interferir con los sensores vecinos. Para determinar la ubicación óptima de la matriz de nanosensores, se realizaron simulaciones de reacción con matrices de nanoagujeros en diversas configuraciones. Primero, se creó un modelo de un canal de flujo laminar con las dimensiones mencionadas en relación con la Figura 5 ( $w = 500 \mu\text{m}$ ,  $l = 5000 \mu\text{m}$ ) y una profundidad igual a  $10 \mu\text{m}$  en FLUENT, un software de dinámica de fluidos computacional. Se resolvieron las ecuaciones de continuidad, Navier-Stokes, de transporte de masa y de velocidad de reacción en 500.000 nodos para un caso de estado estacionario de una reacción de  $\text{NaOH} + \text{HCl}$  en el espacio 3D para obtener un campo de temperatura en la superficie de la lámina metálica, que se muestra en la Figura 10. El modelo asume una condición de no deslizamiento en las paredes del canal y que las paredes laterales son adiabáticas. Se modelaron las propiedades termofísicas de la mezcla de fluidos como si fueran las propiedades del agua a 298,15 K, ya que el cambio de temperatura de la reacción es de solo de  $\pm 5 \text{ K}$  y la mezcla es principalmente agua. La Figura 10 muestra el mapa de temperatura producido por este modelo.

Se realizó un análisis de límites térmicos en el modelo simulado para analizar la temperatura en la dirección  $y$ . Se encontró que la temperatura detectada sobre la vecindad inmediata de la lámina metálica era 99,8610 % de la temperatura promedio normal al canal. Dado que los sensores SPR, como las matrices de nanoagujeros, solo detectan la temperatura en el campo cercano, una anchura de  $\lambda/4$  de la longitud de onda incidente ( $\sim 150 \text{ nm}$ ), esto valida que la detección de campo cercano representa con precisión la temperatura de todo el canal.

Un modelo válido para un campo de temperatura de una reacción en un canal de flujo laminar también permite determinar el espaciado óptimo de la matriz de nanoagujeros. Para el análisis de espaciado de los sensores, la temperatura, el flujo de calor y la concentración en la superficie de la lámina metálica (superficie  $y = 0$ ) se toman del modelo FLUENT. Cada término de la Ecuación 13 se estima en puntos equidistantes para múltiples valores de espaciado y la entalpía de formación en cada matriz se puede estimar usando la siguiente ecuación:

$$\Delta H_{\text{formación}} = \frac{d \int_{z_1}^{z_2} \int_{x=0}^{x_{\text{max}}} \dot{q}(z) dx dz}{\left( \dot{m}_{\text{NaCl}}^{\text{salida}} - \dot{m}_{\text{NaCl}}^{\text{entrada}} \right) M_{\text{NaCl}}}$$

Ecuación 14

Por lo tanto, la entalpía de formación se estima utilizando diversos algoritmos de espaciado de matriz y el mapa del coeficiente de pérdida de calor conocido por la simulación. El éxito de cada algoritmo de espaciado está determinado por la precisión de la entalpía de formación estimada. Las estimaciones de otras medidas conocidas, como la fracción de masa y la entropía, se pueden usar como alternativa o además de la entalpía de formación. El procedimiento se repite para diferentes valores de espaciado horizontal entre matrices, para diferentes velocidades de entrada y diferentes intervalos en la dirección  $z$ . El procedimiento también puede repetirse para diferentes disposiciones de matrices, tasas de difusión u otras variables.

Se investigaron tres algoritmos de espaciado de sensores:

1. Tomando como referencia la pared en  $x=0$  y colocando los sensores equidistantes con la distancia de espaciado de los sensores;
2. Tomando como referencia el centro del canal con respecto a  $x$ , colocando sensores equidistantes con la distancia de espaciado de sensores;
3. Tomando el centro del canal con respecto a  $x$  como referencia, de forma que el primer sensor esté a la mitad del valor de separación del sensor desde el centro (es decir, sin sensor en el centro).

Además, se investigó el espaciado para velocidades de flujo de  $0,0005 \text{ m/s}$ ,  $0,005 \text{ m/s}$  y  $0,05 \text{ m/s}$ . Como era de esperar, para un canal de una longitud dada, se requiere una mayor resolución en la dirección  $x$  para velocidades de flujo más altas, ya que el ancho de difusión en la dirección  $x$  es pequeño debido al bajo tiempo de residencia. Como las diferentes reacciones tendrán diferentes difusividades, la velocidad de flujo de los reactivos se puede variar para lograr la resolución necesaria con respecto a un espaciado de matriz de nanoagujeros establecido.

Para espaciamentos de sensores que van de 2  $\mu\text{m}$  a 120  $\mu\text{m}$  espaciados con cada uno de los algoritmos de espaciado mencionados anteriormente, el porcentaje de error comienza a desviarse después de 40  $\mu\text{m}$  debido a las formas de las curvas de concentración, temperatura y coeficiente de pérdida de calor como funciones de  $x$ , que son similares a un distribución gaussiana. La figura 11 representa las curvas del coeficiente de pérdida de calor 1102 y de temperatura 1104 frente a  $x$  en  $z = 50 \mu\text{m}$  para un caudal de 0,0005 mls. Las curvas de fracción de masa 1106 y 1108 de NaCl en  $Z_1 = 50 \mu\text{m}$  y  $Z_2 = 800 \mu\text{m}$ , respectivamente, están debajo de las curvas 1102 y 1104. Una configuración de espaciado de 60  $\mu\text{m}$  puede representar adecuadamente la pérdida de calor y los promedios de temperatura en todo el ancho del canal, pero no la fracción de masa en las regiones cercanas a la entrada. Este comportamiento se debe a los valores bajos del coeficiente de difusividad de masa en la dirección  $x$  en comparación con los valores más grandes de la constante de conductividad térmica (difusividad). En ciertas configuraciones de espaciado, las ubicaciones de los sensores pueden corresponder a ubicaciones donde un único punto puede representar el promedio total de la curva (las inmediaciones de las líneas horizontales en los gráficos de fracción de masa en la Figura 11). Sin embargo, estas ubicaciones dependen de las características de la curva y pueden cambiar con muchos parámetros, como la naturaleza de la reacción y la ubicación  $z$ . Por lo tanto, el análisis de errores debe realizarse con especial precaución. Los resultados muestran que este comportamiento comienza a ocurrir a partir de los 40  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto, en un ejemplo de realización, los sensores están dispuestos en una cuadrícula con una separación de 10 a 30  $\mu\text{m}$ .

Este tipo de modelado se puede usar para determinar el espaciado óptimo del sensor para otros caudales. En general, los caudales más altos requieren sensores espaciados más cerca en la dirección  $x$ , transversalmente en el ancho del canal. Además, el modelo que se muestra se puede utilizar para examinar otros algoritmos de sensores de espaciado, como el espaciado en el que los sensores están más concentrados hacia la mitad del canal. Para el modelado se puede utilizar FLUENT u otro software de dinámica de fluidos computacional.

#### Aplicación al desarrollo de medicamentos

La figura 12 es un gráfico que ilustra la relación entre el número de compuestos y el tiempo en un proceso de investigación y desarrollo farmacéutico. Inicialmente, hay una gran cantidad de compuestos que se investigan para un objetivo terapéutico particular. Actualmente, se utiliza un cribado de alto rendimiento al comienzo del proceso, y la calorimetría generalmente no se realiza en los compuestos hasta bastante tarde en el proceso de desarrollo. Un objetivo del aparato de calorimetría microfluídica descrito en el presente documento es permitir mediciones calorimétricas sensibles, rápidas y de bajo volumen para que la calorimetría pueda utilizarse antes en el proceso de desarrollo del fármaco, empujando la curva del número de compuestos frente al tiempo hacia la línea de puntos inferior.

La figura 13 es un diagrama de flujo para un método de investigación y desarrollo farmacéutico. En primer lugar, se realiza un cribado de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés) (paso 1302). HTS es un método automatizado para determinar si una entidad biológica, como una proteína, células, un embrión, etc., reacciona con un compuesto. Los sistemas HTS actuales pueden analizar hasta 100.000 compuestos por día, y los avances en el cribado tipo HTS aumentan continuamente su rendimiento. Si bien HTS permite probar una gran cantidad de compuestos, solo brinda un resultado binario para determinar si un compuesto está activo o no. Pueden usarse adicional o alternativamente otros métodos de selección que son prácticos para realizar en un gran número de compuestos.

Después del cribado de alto rendimiento y/u otras pruebas de exploración, los compuestos se analizan a continuación usando calorimetría (etapa 1304). Los compuestos que reaccionaron en un cribado de alto rendimiento se prueban actualmente mediante dos técnicas de calorimetría: calorimetría diferencial de barrido y calorimetría isotérmica de barrido. El método de calorimetría microfluídica de la invención descrito en este documento puede reemplazar tanto la calorimetría diferencial de barrido como la calorimetría isotérmica de barrido con resultados más rápidos y potencialmente utilizando tan solo una milésima parte del consumo de reactivos de los calorímetros actuales. Como se discutió anteriormente con relación a la Figura 9, los datos ópticos 1314 se procesan para determinar las características entálpicas de la interacción fármaco-proteína (1306), produciendo datos calorimétricos 1316. Estos datos luego se analizan para filtrar fármacos candidatos (1308). El filtrado puede devolver todos los compuestos con entalpías y/o entropías en un cierto intervalo. El filtrado puede seleccionar alternativamente un número dado de compuestos con los mejores resultados. Las medidas calorimétricas pueden ponderarse y sumarse para dar a cada compuesto una puntuación compuesta. El resultado de la filtración es un subconjunto de fármacos candidatos 1318 que se seleccionan para una primera ronda de un ensayo clínico después de una revisión de un comité institucional. Es posible que se requieran otros estudios preclínicos, como experimentos in vivo o in vitro, antes de un estudio clínico.

Si bien aquí se han mostrado y descrito realizaciones preferibles de la presente comunicación, será obvio para los expertos en la técnica que dichas realizaciones se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la comunicación y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones queden cubiertos por ello.

#### Referencias

Krishnan, A. et al. "Resonancia acoplada de forma evanescente en la transmisión mejorada de plasmones de superficie", Optics Communications, vol. 200, págs. 1-7, 2001.

Ji, J. et al. "Sistema basado en matriz de nanoagujeros de alto rendimiento para controlar múltiples eventos de unión

en tiempo real", *Analytical Chemistry*, vol. 80, págs. 2491-2498, 2008.

Leach, A. et al. "Análisis de inyección de flujo en un formato de microfluidos", *Analytical Chemistry*, vol. 75, núm. 5, págs. 967-972,2003.

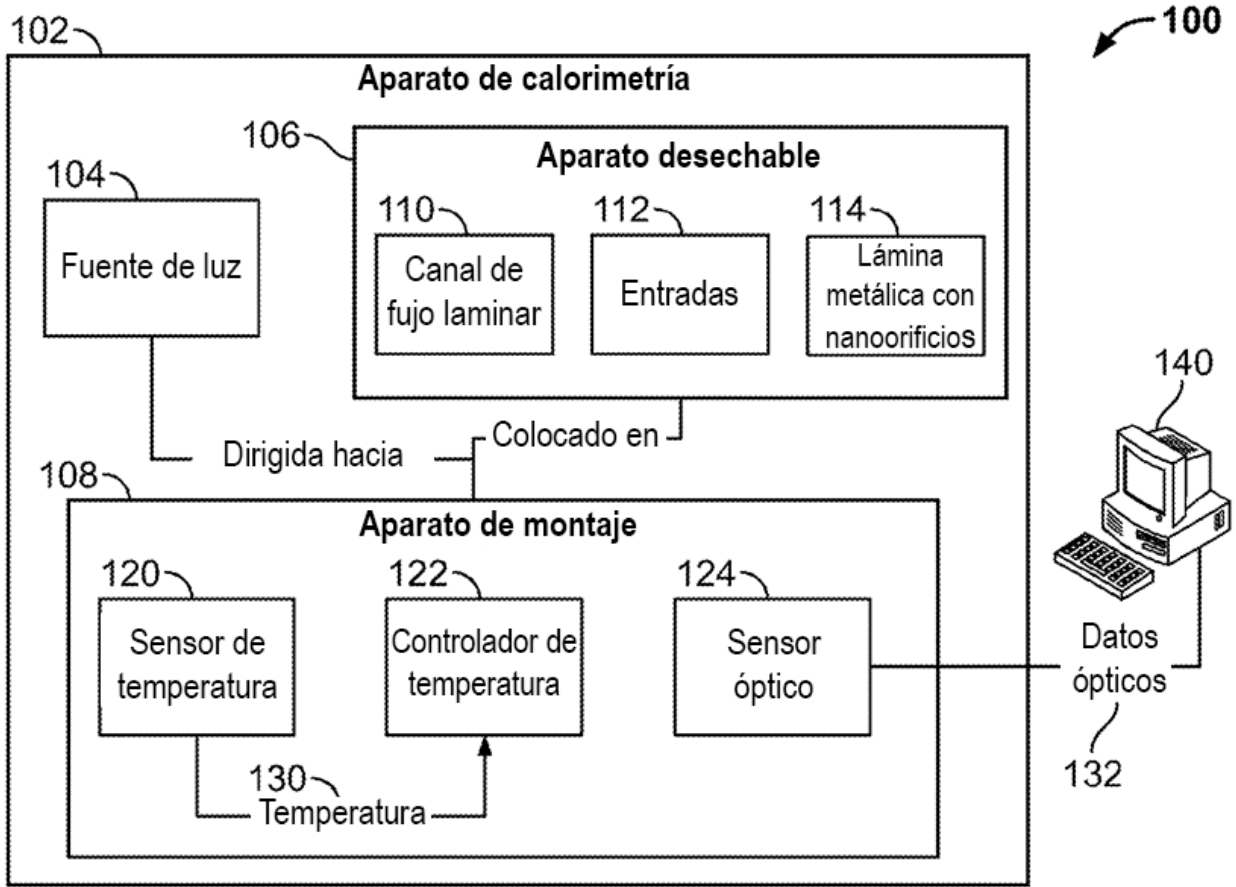
5 Lindquist, N. et al. "Imágenes de resonancia de plasmones de superficie con resolución submicrónica habilitadas por matrices de nanoagujeros con espejos de Bragg circundantes para mejorar la sensibilidad y el aislamiento", *Lab on a Chip*, vol. 9, págs. 382-387,2009.

Pradere, C. et al. "Procesamiento del campo de temperatura en microrreactores químicos con termografía infrarroja", *QIRT*, vol. 3, núm. 1, págs. 117-135,2006.

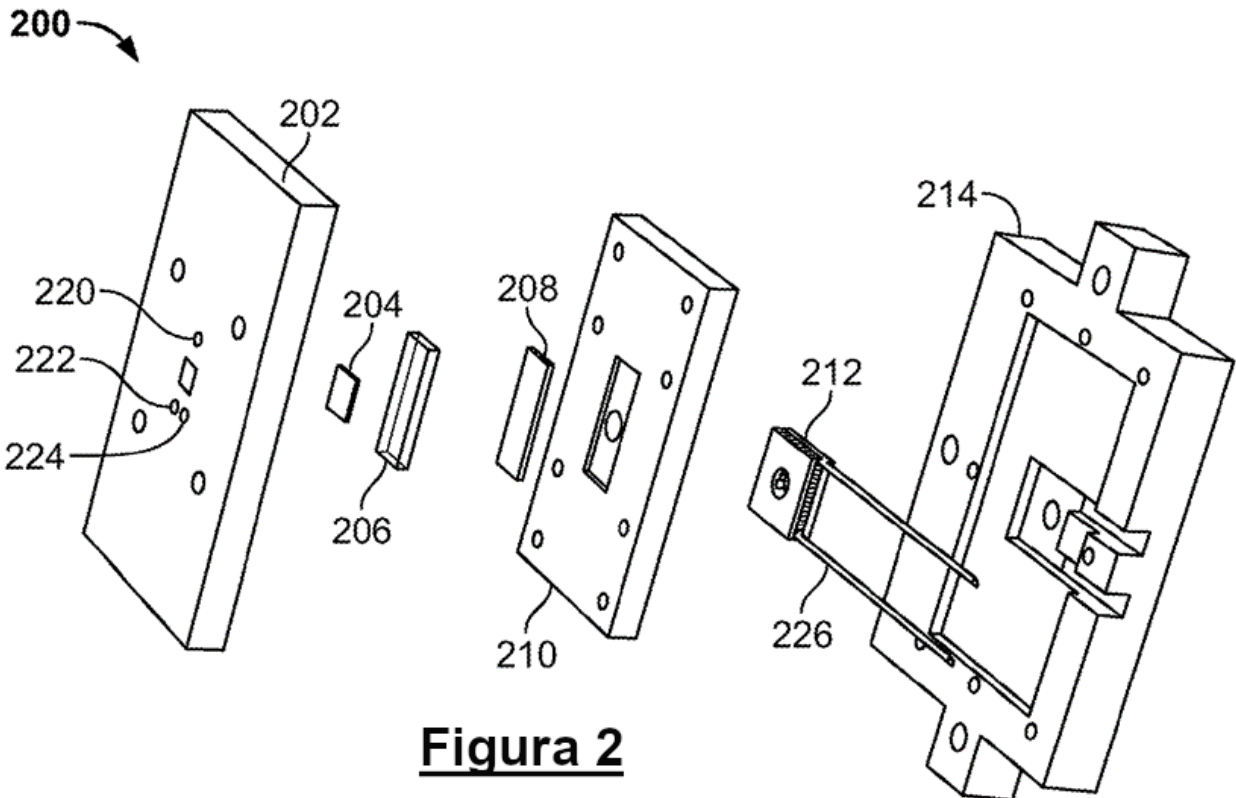
**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema para calorimetría que comprende:  
un canal de flujo laminar de microfluidos, una parte del cual incluye una cámara de reacción (715);  
una primera entrada (722) acoplada a la cámara de reacción (715);  
5 una segunda entrada (721) acoplada a la cámara de reacción (715);  
una pluralidad de sensores a microescala (502) dispuestos a lo largo de la cámara de reacción microfluídica (715);  
un primer inyector de fluido acoplado a la primera entrada (722) configurado para inyectar un primer bolo de reactivo de un primer fluido en la cámara de reacción (715);  
10 un segundo inyector de fluido acoplado a la segunda entrada (721) configurado para inyectar un segundo fluido en la cámara de reacción (715) de manera que el volumen del segundo fluido en la cámara de reacción (715) sea entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 veces mayor que el volumen del primer bolo de reactivo en la cámara de reacción (715); y  
un procesador configurado para calcular un valor de calorimetría basado en una pluralidad de mediciones de temperatura realizadas en cada uno de dos o más de la pluralidad de sensores de microescala (502), siendo la pluralidad de mediciones de temperatura realizadas sobre una pluralidad de primeras concentraciones de reactivo a medida que el primer bolo de reactivo se interdifunde con el segundo fluido y fluye a través de la cámara de reacción microfluídica (715).  
15
2. El sistema de la reivindicación 1, en el que el inyector de fluido incluye un extremo proximal acoplado a un extremo proximal de la primera entrada (722) y un extremo distal acoplado a un extremo distal de la primera entrada (722), y una válvula acoplada al extremo proximal del inyector de fluidos que se configura para introducir selectivamente un fluido en el inyector de fluidos para eyectar dicho primer bolo de reactivo almacenado en el inyector de fluidos hacia la primera entrada (722).  
20
3. El sistema de la reivindicación 1, en el que el primer inyector de fluido se configura para contener entre aproximadamente 5 nl y aproximadamente 250 nl.
- 25 4. El sistema de la reivindicación 1, en el que los sensores a microescala (502) son conjuntos de nanoagujeros en una capa de metal dispuesta debajo de la cámara de reacción (715).
5. El sistema de la reivindicación 4, en el que las matrices de nanoagujeros están rodeadas por espejos dieléctricos.
6. Un método para calorimetría que comprende;  
proporcionar el sistema de calorimetría de la reivindicación 1;  
30 hacer fluir un primer fluido a través de la primera entrada (722) hacia la cámara de reacción microfluídica (715);  
hacer fluir el segundo fluido a través de la segunda entrada (721) hacia la cámara de reacción microfluídica;  
inyectar el primer bolo de reactivo en la primera entrada a través del inyector de fluido, de modo que el primer reactivo entre en contacto con el segundo fluido en la cámara de reacción microfluídica; y  
35 calcular un valor de calorimetría basado en una pluralidad de mediciones de temperatura realizadas en cada uno de dos o más de la pluralidad de sensores de microescala (502), siendo la pluralidad de mediciones de temperatura realizadas sobre una pluralidad de concentraciones de reactivo a medida que el primer bolo de reactivo fluye a través de la cámara de reacción microfluídica.
7. El método de la reivindicación 6, que comprende además seleccionar una parte del valor calorimétrico que se aproxima a un segundo valor calorimétrico obtenido cuando un reactivo del primer bolo de reactivo flúa en estado estacionario.
- 40 8. El método de la reivindicación 6, que comprende, además:  
inyectar un segundo bolo de reactivo en la primera entrada a través del primer inyector de fluido, de modo que el segundo bolo de reactivo entre en contacto con el segundo fluido en la cámara de reacción microfluídica; y  
calcular un segundo valor de calorimetría sobre una segunda pluralidad de concentraciones de reactivo a medida que el segundo bolo de reactivo fluye a través de la cámara de reacción microfluídica.
- 45 9. El método de la reivindicación 6, en el que calcular un valor de calorimetría comprende calcular al menos uno de entre los siguientes: una entalpía de la reacción, una constante de enlace de la reacción, un valor de energía libre de Gibbs, un cambio en la energía libre, un valor de entropía y un cambio en entropía

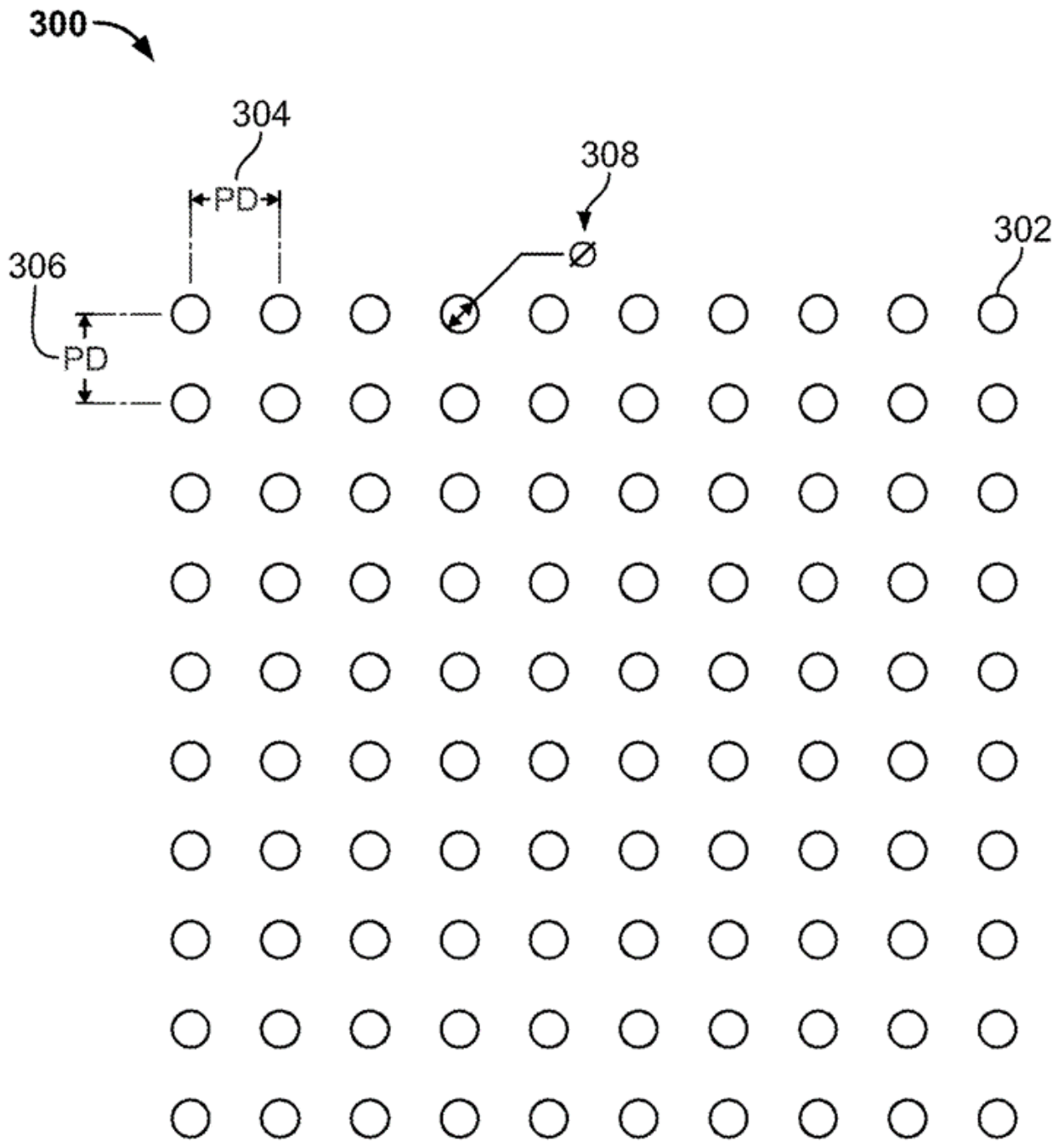
10. El método de la reivindicación 6, en el que el volumen del primer bolo de reactivo está entre alrededor de 10 nl y alrededor de 1 microlitro.
11. El método de la reivindicación 6, que comprende además seleccionar un caudal de al menos uno del primer fluido y el segundo fluido en base a la difusividad del primer y segundo fluidos.
- 5 12. El método de la reivindicación 6, en el que el primer bolo de reactivo está entre alrededor de 5 nl y alrededor de 250 nl.
13. El método de la reivindicación 6, que comprende además calcular estimaciones de la concentración del primer bolo de reactivo en una pluralidad de posiciones de sensor de microescala específicas y en una pluralidad de puntos temporales específicos después de que el inyector de fluido inyecte el primer bolo de reactivo.
- 10 14. El método de la reivindicación 6, en el que el primer bolo de reactivo está entre alrededor de 5 nanolitros y alrededor de 50 nanolitros.



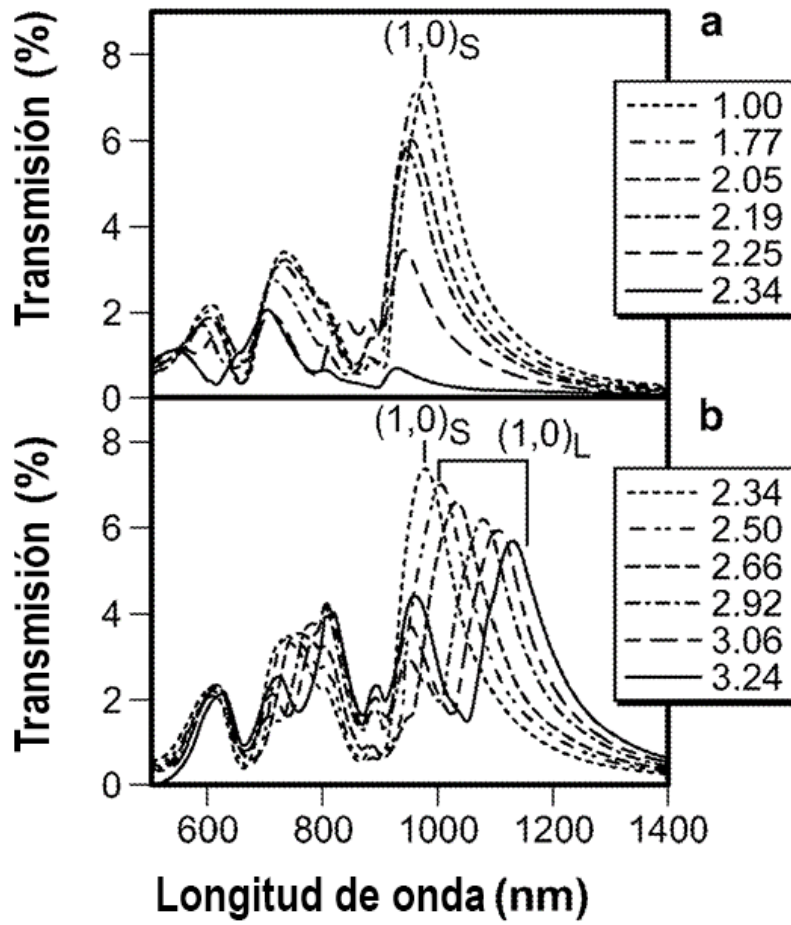
**Figura 1**



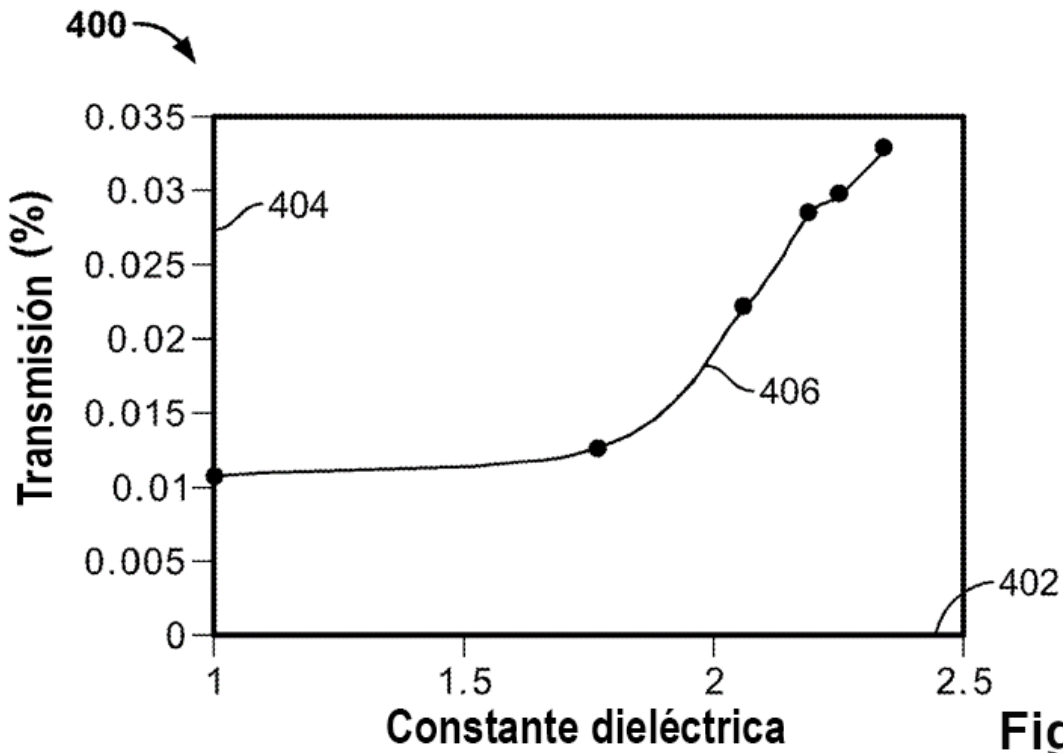
**Figura 2**



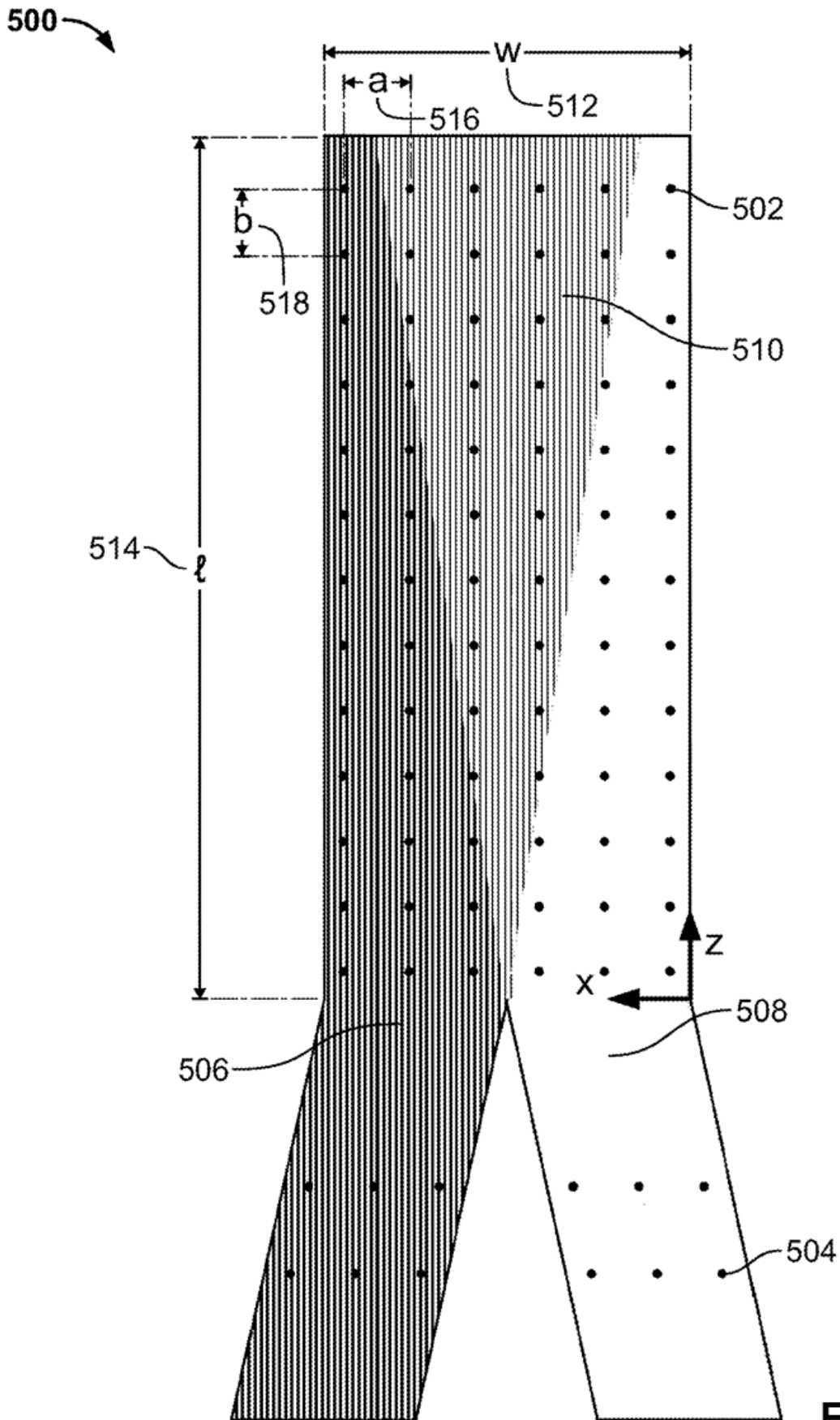
**Figura 3**



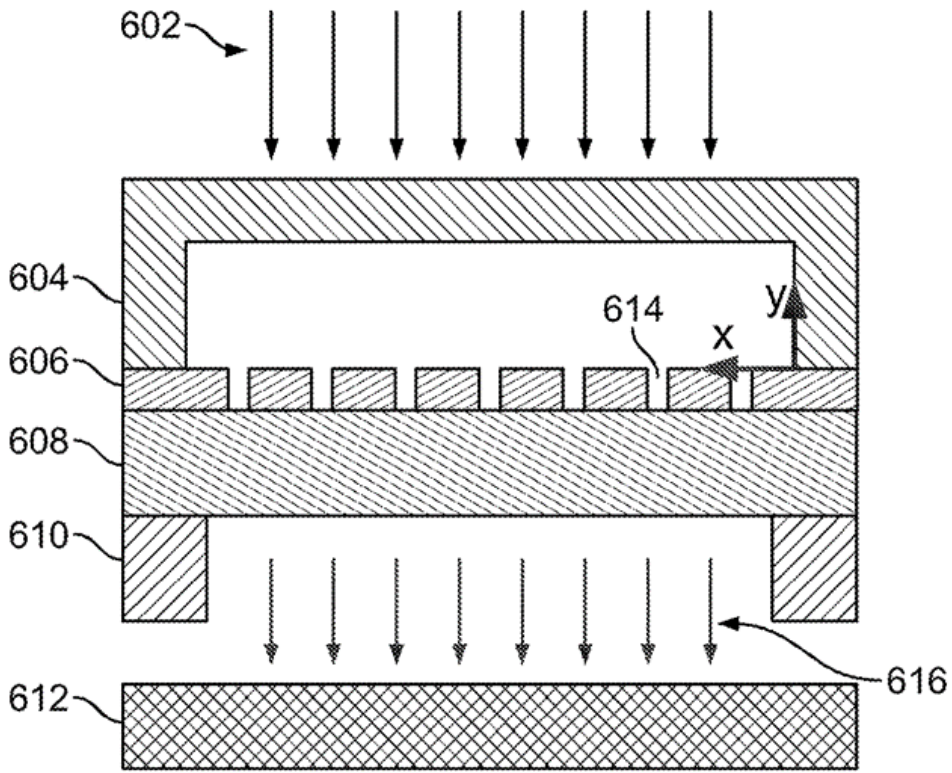
**Figura 4a**



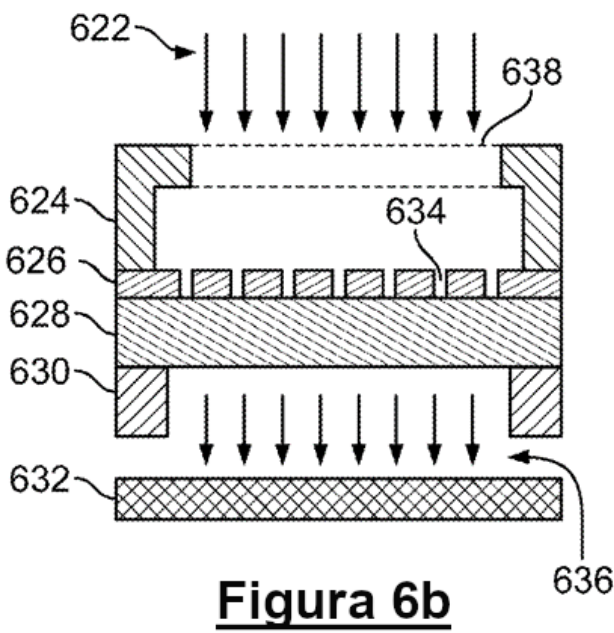
**Figura 4b**



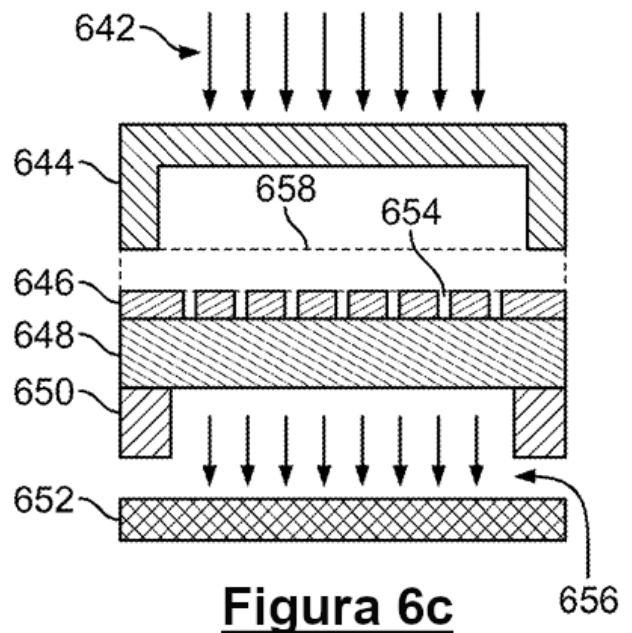
**Figura 5**



**Figura 6a**



**Figura 6b**



**Figura 6c**

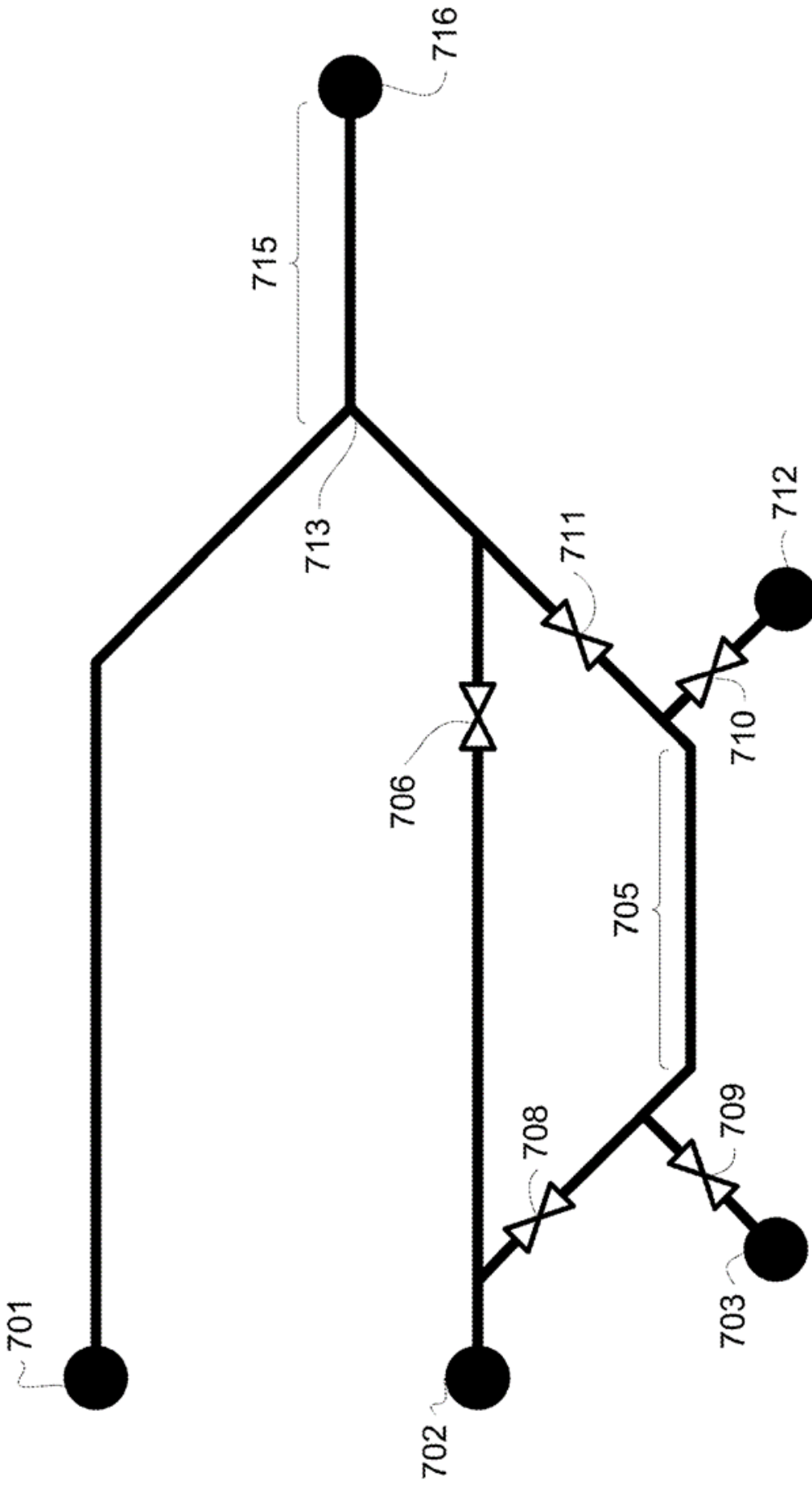
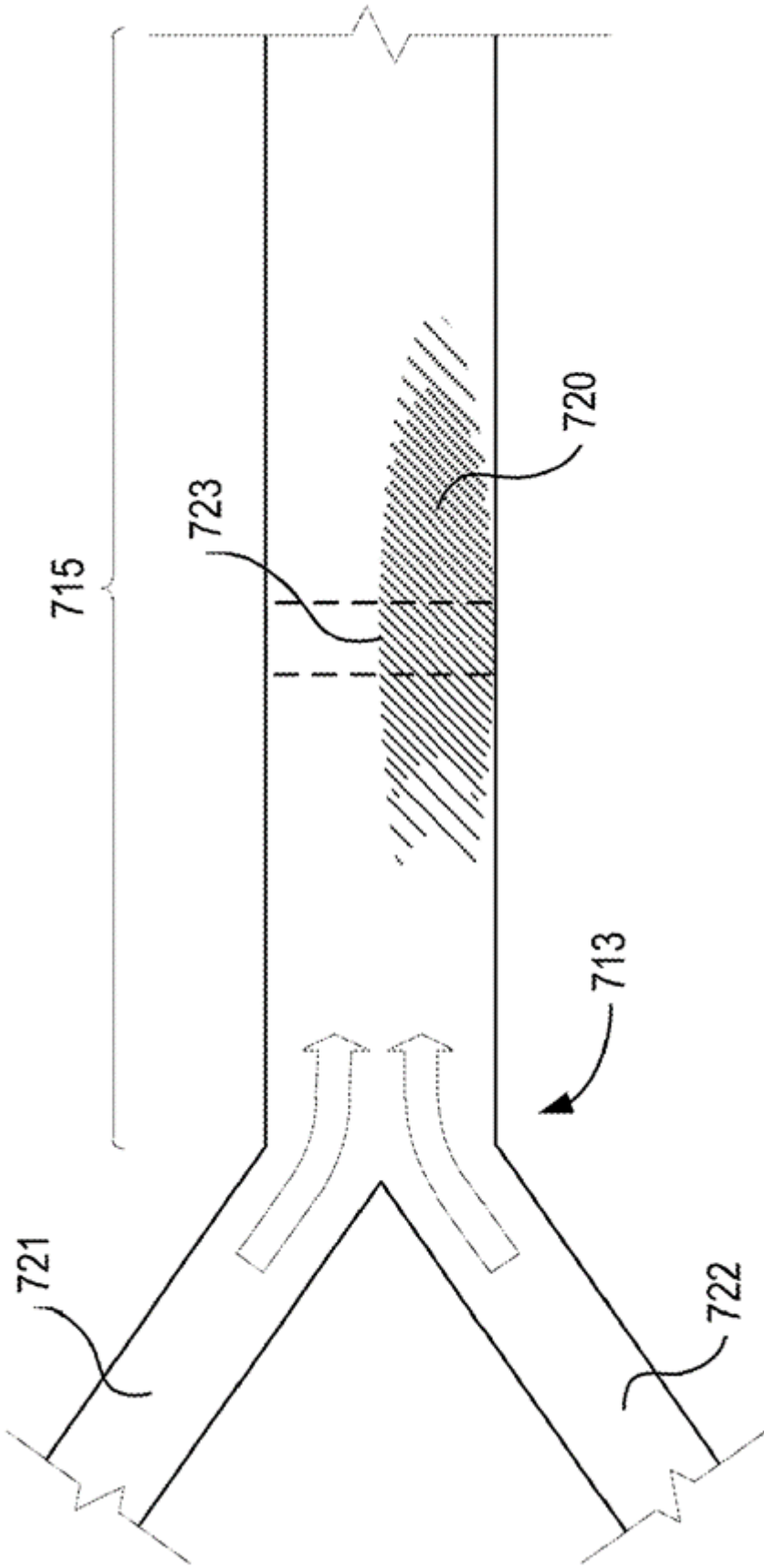
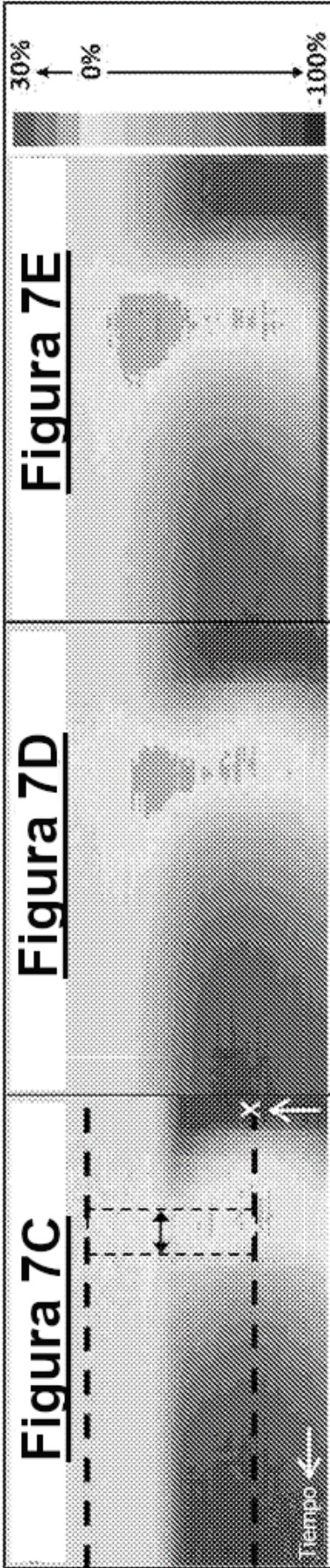
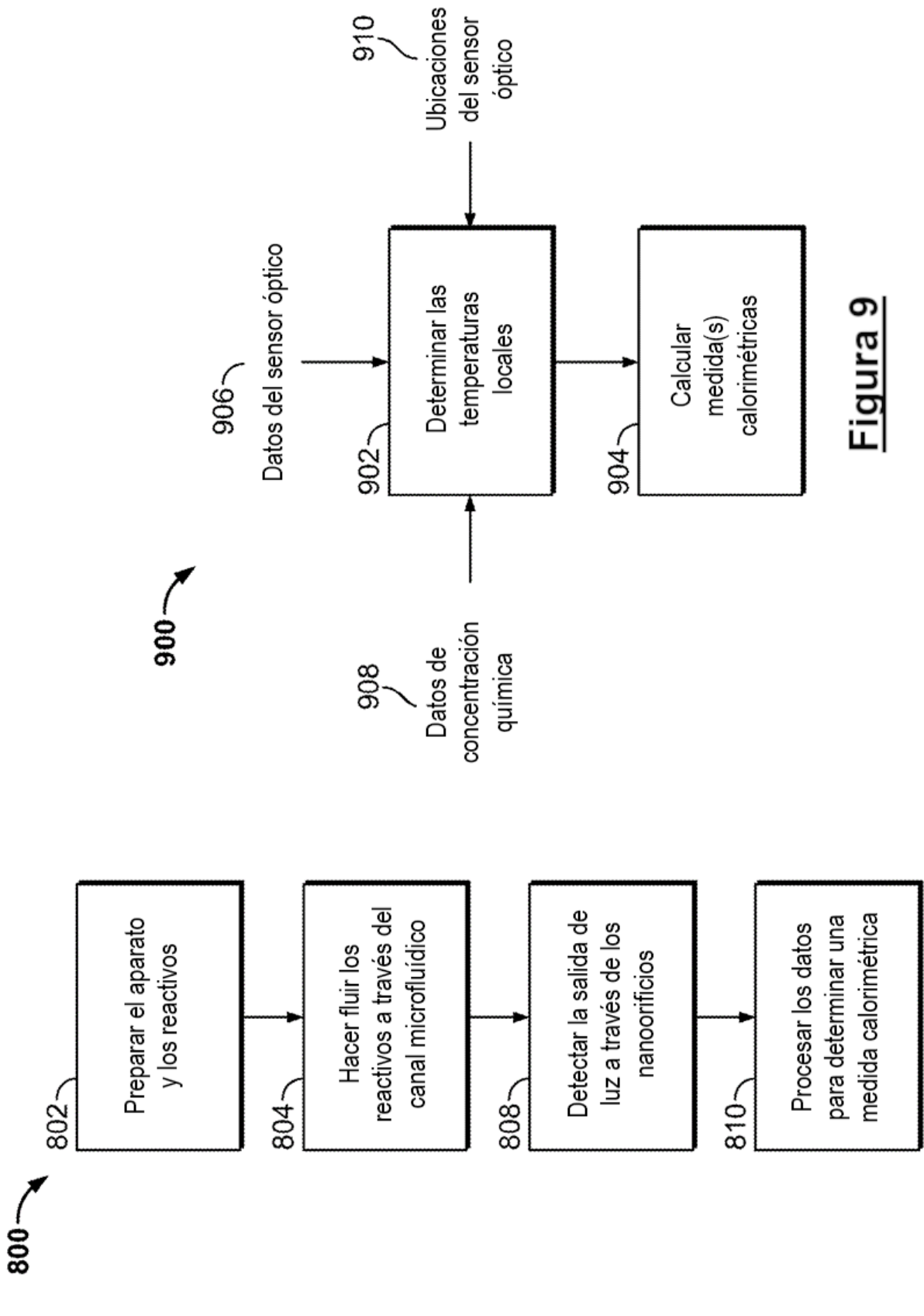


Figura 7A



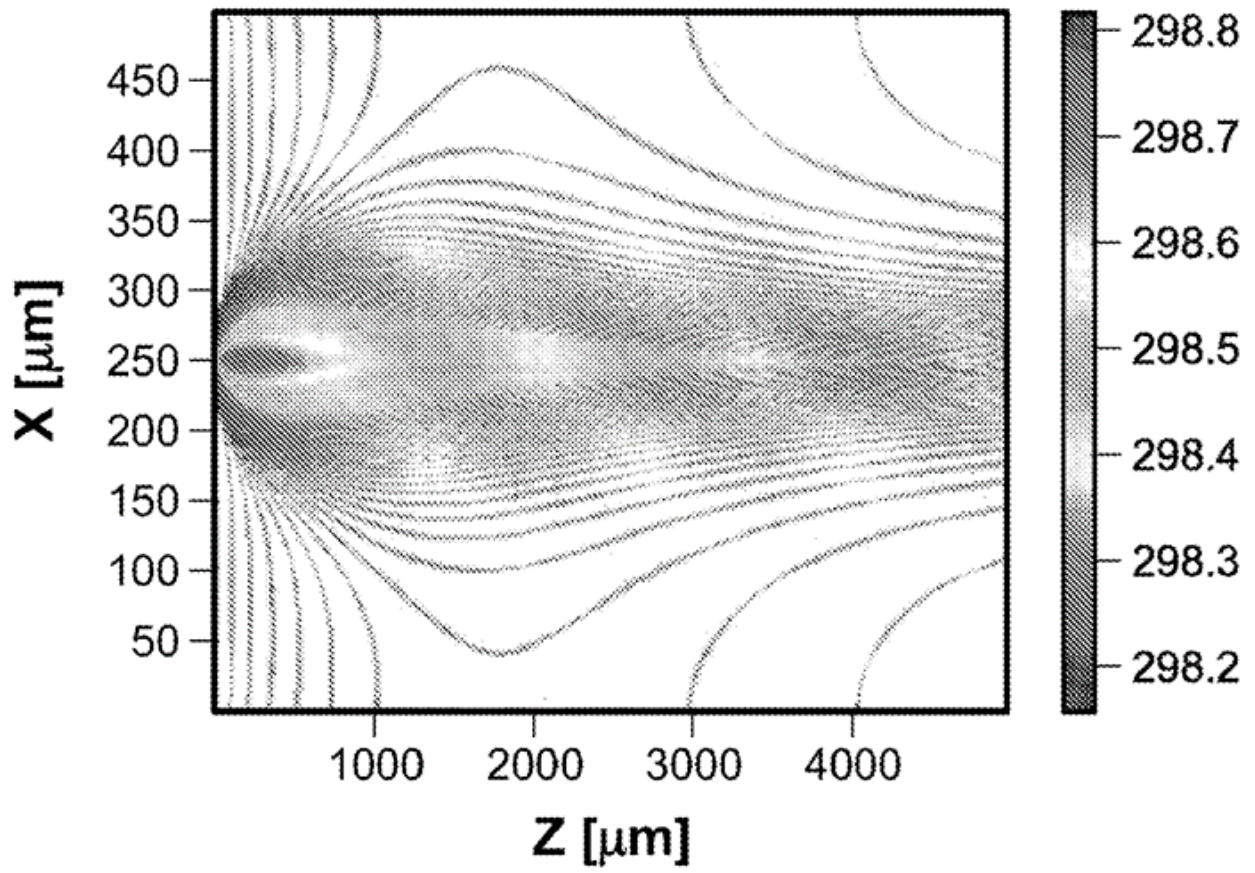
**Figura 7B**





**Figura 9**

**Figura 8**



**Figura 10**

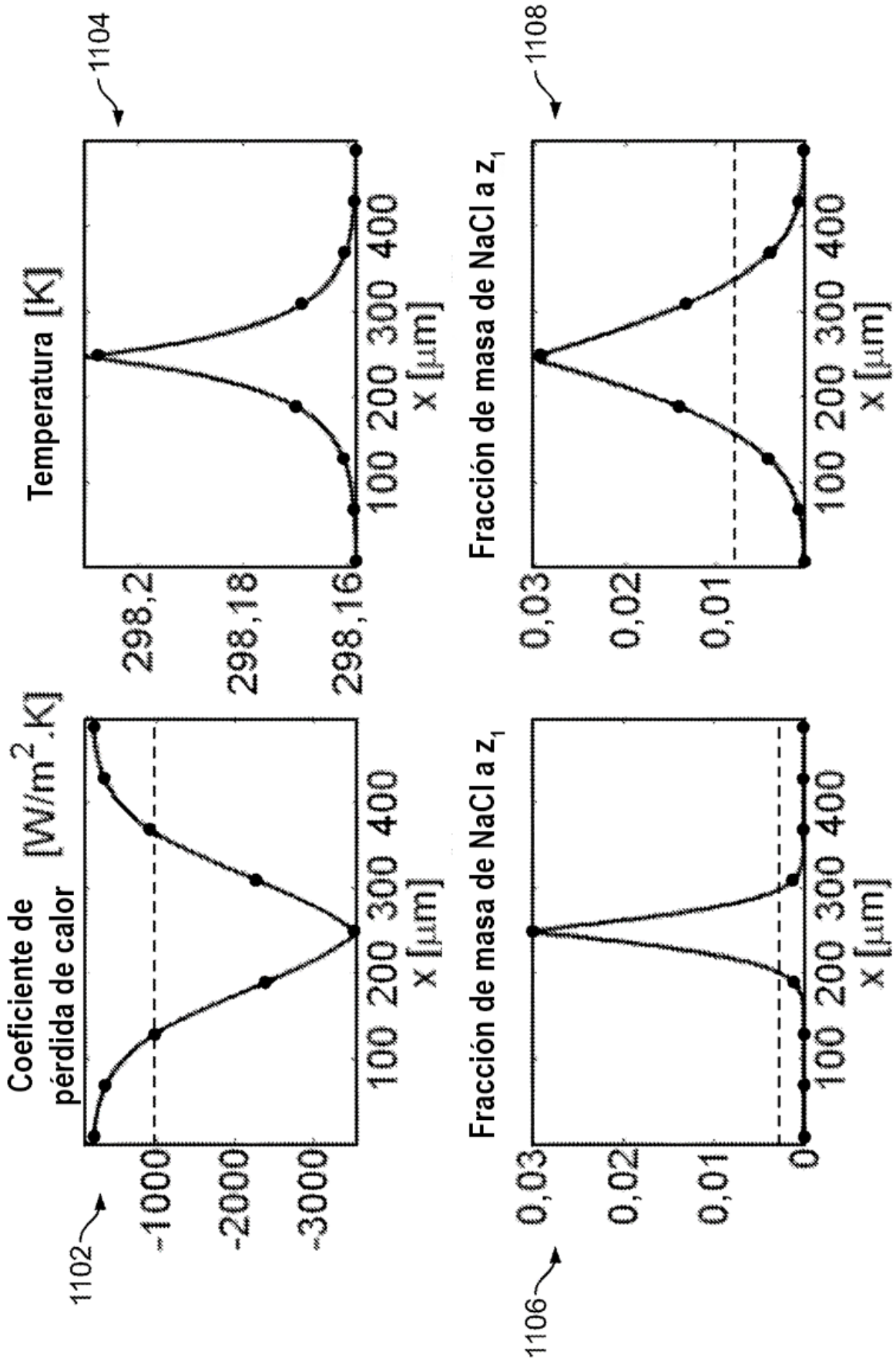
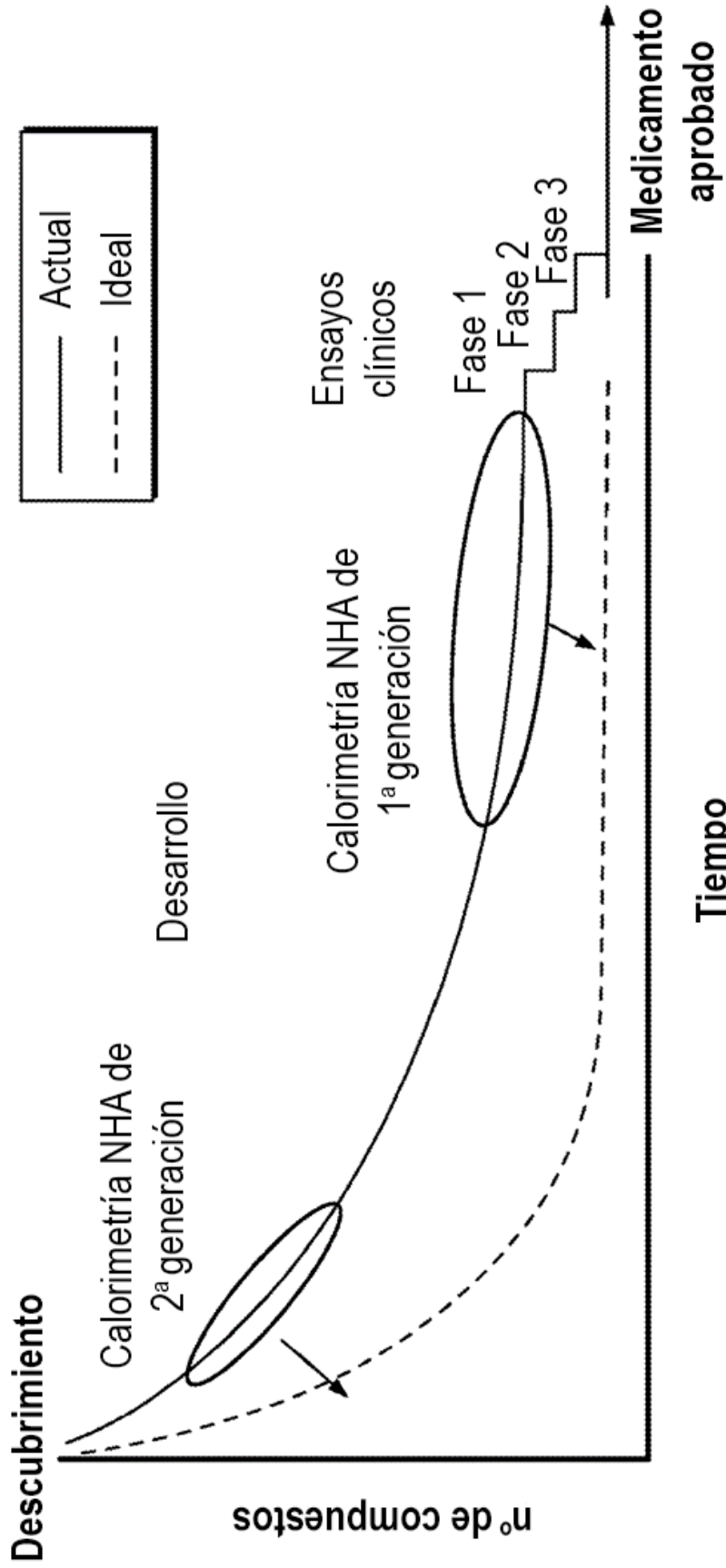
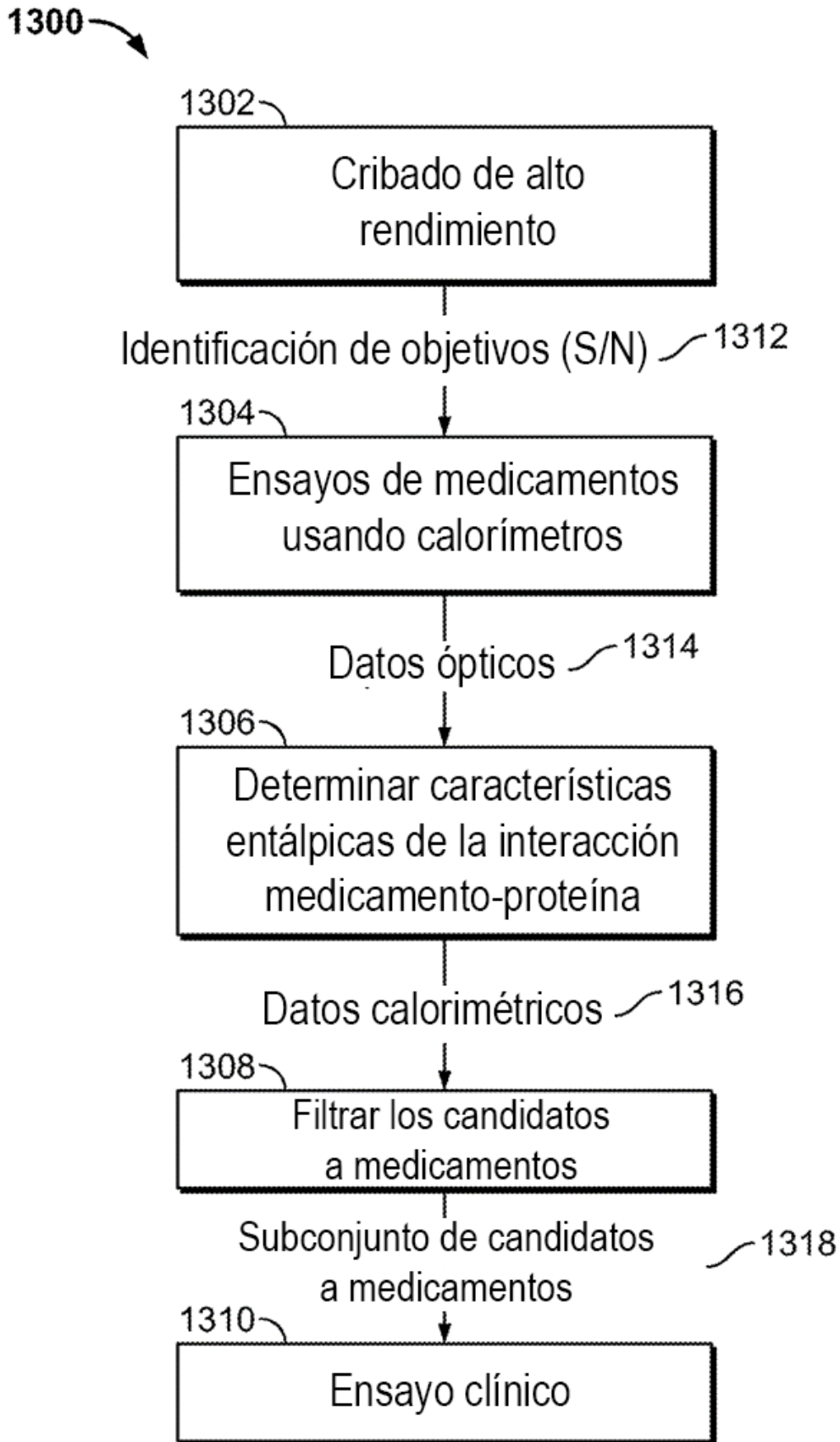


Figura 11



**Figura 12**



**Figura 13**