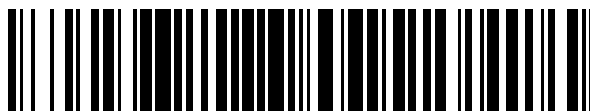


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 800**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G05D 21/02 (2006.01)

G05D 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06734056 .2**

96 Fecha de presentación: **30.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1859330**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54 Título: **Aparatos y métodos para manipular gotitas en una placa de circuito impreso**

30 Prioridad:
28.01.2005 US 648051 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2012

73 Titular/es:
**DUKE UNIVERSITY (100.0%)
UNIVERSITY OFFICE OF SCIENCE AND
TECHNOLOGY, NORTH BUILDING, ROOM 230,
SCIENC
DURHAM, NC 27708, US**

72 Inventor/es:
**PAMULA, VAMSEE, K.;
POLLACK, MICHAEL, G. y
FAIR, RICHARD, B.**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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 2 390 800 T3

DESCRIPCIÓN

Aparatos y métodos para manipular gotitas en una placa de circuito impreso.

Solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud está relacionada con la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de serie 10/253.342, presentada el 24 de septiembre de 2002 y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° de serie 60/648.051, presentada el 28 de enero de 2005.

Campo técnico

- 10 La materia desvelada en el presente documento se refiere, en general, a aparatos y métodos para realizar micromanipulación de gotitas sobre un sustrato de placa de circuito impreso (PCB). Más particularmente, la materia desvelada en el presente documento se refiere a aparatos y métodos para fabricar y manejar sistemas microfluídicos a base de gotitas basados en tecnología de PCB convencional en los que las gotitas se mueven sobre la superficie de la PCB mediante la aplicación de potenciales eléctricos a electrodos definidos en la PCB. La materia desvelada en el presente documento también describe el uso de una máscara de soldadura como aislante de electrodos para la manipulación de gotitas, así como técnicas para adaptar otras capas y materiales de PCB tradicionales para
15 microfluídica a base de gotitas.

Antecedentes

- 20 La microfluídica es un campo que avanza rápidamente, que trata con el estudio de fluidos con un volumen por debajo del microlitro. Los dispositivos microfluídicos cada vez se aplican más y están más aceptados en muchos campos de biología, química, medicina, monitorización del entorno, descubrimiento de fármacos y componentes electrónicos para el consumidor. Se espera que la miniaturización de dispositivos tradicionales, particularmente dispositivos analíticos, conduzca a muchos beneficios incluyendo un consumo (y un coste) reducido de reactivos y muestras, un mayor rendimiento y automatización, tiempos de análisis más rápidos e instrumentación más fiable, económica y portátil. Dado que más funcionalidad viene incluida en estos dispositivos, los microsistemas de análisis total (μ TAS) totalmente integrados o "laboratorios en un chip" se están convirtiendo en una realidad y son cada vez
25 más importantes.

- El laboratorio en un chip es un paradigma emergente que pretende miniaturizar e integrar el manejo de fluidos en un chip. Un laboratorio en un chip debe permitir el dispensado, transporte, mezclado, incubación, detección/separación de fluido y el desechado de residuos para que sea una auténtica unidad autónoma. Los sistemas de laboratorio en un chip microfluídicos pueden clasificarse ampliamente en sistemas de flujo continuo y de flujo discreto. Un sistema de flujo continuo es auto-descriptivo y en los sistemas de flujo discreto el fluido se separa en gotitas. Una limitación habitual de los sistemas de flujo continuo es que el transporte de fluido está confinado físicamente a canales fijos mientras que los sistemas basados en gotitas (o de flujo discreto) pueden estar confinados a canales físicos o funcionar en sistemas planos y sin canales. Los mecanismos de transporte usados generalmente en los sistemas de flujo continuo son impulsados por presión mediante bombas externas o son impulsados de forma electrocinética por
30 altos voltajes. Los sistemas de flujo continuo pueden implicar una compleja canalización y requieren grandes instrumentos de soporte en forma de válvulas o suministros de energía externos. En otro enfoque de sistemas a base de canales, las fuerzas centrífugas impulsan los fluidos para que fluyan de forma unidireccional en los canales. El paradigma microfluídico de flujo continuo tiene limitaciones de versatilidad, haciendo difícil conseguir altos grados de integración y control funcionales.

- 40 Los sistemas microfluídicos de flujo discreto o a base de gotitas han estado progresando de forma constante hasta cumplir la promesa del concepto de laboratorio en un chip para manejar todas las etapas de análisis, incluyendo extracción de muestras, preparación de muestras, procesamiento de muestras incluyendo transporte, mezclado e incubación, detección y manejo de residuos. Estas etapas se han diseñado para ser realizadas en un chip sin sistemas de apoyo fuera del chip significativos. Recientemente se han desarrollado varios enfoques de flujo discreto para manipular gotitas basados en litografía blanda multicapa, flujos multifase hidrodinámicos, técnica de electrowetting continua, electrowetting en dieléctrico (EWOD), dielectroforesis, electrostática y ondas acústicas en superficie. Algunas de las técnicas anteriores manipulan gotitas o lingotes en canales confinados físicamente mientras que otras técnicas permiten la manipulación de gotitas sobre superficies planas sin canales físicamente definidos algunos. Los enfoques a base de gotitas sin canales se han denominado como "microfluídica digital", dado
45 que el líquido se separa y se manipula de forma programable.

- Los protocolos a base de gotitas son muy similares a protocolos biométricos a escala de laboratorio que también se ejecutan generalmente en volúmenes discretos de fluidos. Por lo tanto, los protocolos establecidos pueden adaptarse fácilmente al formato microfluídico digital. Algunas de las características distintivas de los sistemas microfluídicos digitales incluyen: reconfigurabilidad (las operaciones y las trayectorias de las gotitas se seleccionan mediante un panel de control del software para permitir a los usuarios crear cualquier combinación de operaciones microfluídicas sobre la marcha); la programabilidad del software también da como resultado flexibilidad del diseño donde un chip procesador microfluídico genérico puede diseñarse y reprogramarse para diferentes aplicaciones; pueden implementarse etapas de ejecución condicionales, dado que cada operación microfluídica puede realizarse
55

bajo en control directo de un ordenador para permitir la máxima flexibilidad operacional; transporte de gotitas multidireccional dado que los canales solamente existen en sentido virtual y pueden reconfigurarse al instante mediante el software; pequeños volúmenes de gotita ($< 1 \mu\text{l}$); funcionamiento completamente electrónico sin usar bombas o válvulas externas; control simultáneo e independiente de muchas gotitas; y funcionamiento sin canales (donde no se requiere cebado).

Muchas tecnologías de laboratorio en un chip actuales (incluyendo dispositivos tanto de flujo continuo como de flujo discreto) son relativamente inflexibles y están diseñados para realizar solamente un único ensayo o un pequeño conjunto de ensayos muy similares. Debido a las disposiciones fijas de los actuales chips microfluídicos, se requiere un nuevo diseño de chip para cada aplicación, lo que hace costoso desarrollar nuevas aplicaciones. Además, muchos de estos dispositivos se fabrican usando costosas técnicas de microfabricación derivadas de la fabricación de circuitos semiconductores integrados. Como resultado, las aplicaciones para dispositivos microfluídicos se expanden de forma relativamente lenta debido al coste y al esfuerzo requeridos para desarrollar nuevos dispositivos para cada aplicación específica. Aunque la fabricación por lotes permite que los dispositivos microfabricados sean económicos cuando se producen en masa, el desarrollo de nuevos dispositivos puede ser prohibitivamente costoso y requerir mucho tiempo debido a los altos costes de desarrollo de prototipos y el largo tiempo de respuesta asociado a las técnicas de microfabricación de semiconductores convencionales. Para ampliar la gama de aplicaciones y el impacto de la microfluídica en medicina, el descubrimiento de fármacos, la monitorización del entorno y de alimentos, y otras áreas incluyendo componentes electrónicos para el consumidor, existe una necesidad percibida desde hace tiempo tanto de enfoques microfluídicos que proporcionen dispositivos integrados más reconfigurables y flexibles, así como de técnicas para desarrollar y fabricar de forma más económica y rápida estos chips.

En los últimos varios años se han producido avances utilizando diferentes enfoques para microfluídica en base a la manipulación de gotitas de tamaño del nanolitro individuales mediante control eléctrico directo. Los ejemplos de dichos sistemas pueden encontrarse en la Patente de Estados Unidos Nº 6.911.132 y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2004/0058450, ambas de Pamula et al., (y asignadas habitualmente al Cesionario de la presente materia).

El documento US-A-2004/0055891 también desvela un aparato para manipular gotitas que comprende un diseño de electrodo de lado único en el que todos los elementos conductores están contenidos en una superficie en la cual son manipuladas las gotitas, aunque puede proporcionarse una superficie adicional paralela a la primera superficie para contener las gotitas a manipular. Las gotitas se manipulan realizando técnicas basadas en electrowetting, en las que a electrodos contenidos en o embebidos en la primera superficie se les suministra y se les priva de energía secuencialmente de manera controlada.

Paik et al., en un artículo titulado "Thermal Effects on droplet transport in digital microfluidics with applications to chip cooling". Ninth Intersociety Conference on Thermal and Thermochemical Phenomena in Electronic Systems, 2004 (ITHERM '04), Las Vegas, NV, Estados Unidos, 1-4 de junio de 2004, Piscataway, NJ, Estados Unidos, IEEE, 2004, páginas 649-654, desvelan una técnica de refrigeración en la que gotitas de líquido discretas con un tamaño de un nanolitro sumergidas en aceite se manipulan sobre una serie de electrodos mediante electrowetting, y describe el efecto de parámetros del sistema dependientes de la temperatura sobre el transporte de las gotitas.

Estas diversas técnicas ofrecen muchas ventajas en la implementación del paradigma microfluídico digital, tal como se ha descrito anteriormente, pero las actuales técnicas de fabricación para producir estos chips microfluídicos siguen dependiendo de técnicas de fabricación bastante complejas y costosas. Estos chips microfluídicos se producen actualmente en fundiciones de microfabricación utilizando costosas etapas de procesamiento basadas en técnicas de procesamiento de semiconductores usadas de forma rutinaria en la industria de la fabricación de circuitos integrados (CI). Además del mayor coste de las técnicas de fabricación de semiconductores, las fundiciones de semiconductores no son fácilmente accesibles y típicamente no ofrecen tiempos de respuesta de fabricación o de desarrollo de prototipos tan rápidos como 24 horas.

Los chips microfluídicos se fabrican generalmente usando procesos a medida basados en procedimientos de microfabricación de semiconductores tradicionales. Los dispositivos se fabrican sobre sustratos de vidrio mediante etapas repetidas de deposición en película fina y modelado usando técnicas fotolitográficas convencionales. Típicamente, se requieren al menos dos capas de metal (una para electrodos y una para el cableado) además de dos o tres capas aislantes, así como capas para formar el separador entre las placas superior e inferior. Debido al alto coste de la fabricación de fotomáscaras y la fabricación de chips, una única ejecución de desarrollo de prototipos que produce hasta 100 dispositivos puede costar hasta 10.000 dólares y requerir tres meses para completarse dependiendo del número de niveles fotolitográficos. Además, dado que el flujo del proceso no está estandarizado, los rendimientos del dispositivo tienden a ser muy bajos durante los varios primeros intentos de fabricar cualquier nuevo diseño.

Los gastos y el tiempo requeridos para el desarrollo de prototipos han sido un grave impedimento para el desarrollo y la optimización de microfluídica a base de gotitas. Además, se espera que los altos costes del chip y la incapacidad de personalizar o mejorar rápidamente los diseños del dispositivo reduzcan las perspectivas comerciales de esta versátil tecnología. A corto plazo, se requiere una tecnología de fabricación más rápida, fiable y

de bajo coste para acelerar el desarrollo y la aceptación por parte del usuario de estos dispositivos. Dado que las estructuras microfluídicas tienden a ser relativamente grandes y rara vez ponen a prueba los límites de las técnicas de fabricación de semiconductores, deben considerarse métodos de fabricación por lotes de menor resolución y menor coste.

En particular, la tecnología de placa de circuito impreso (PCB) ofrece muchas capacidades y materiales similares a la fabricación de semiconductores tradicional aunque a una resolución mucho menor. Las capas de conductores y aislantes se depositan y se modelan fotolitográficamente y se apilan juntas para crear intrincadas estructuras multi-nivel. Para la fabricación de sistemas microfluídicos digitales, se cree que la tecnología de PCB ofrece un excelente compromiso en términos de resolución, disponibilidad, coste y facilidad de fabricación. Se cree, además, que una ventaja adicional del uso una PCB como sustrato es que los dispositivos electrónicos para detectar, controlar o analizar el dispositivo pueden integrarse fácilmente a un coste muy bajo.

Típicamente, la anchura del tubo de cobre y la separación del tubo se miden en milésimas de pulgada (25,4 μm) en un proceso de PCB, que es varios órdenes de magnitud mayor que las características submicrométricas conseguidas generalmente en una fabricación de semiconductores. Típicamente, el procesamiento de PCB no requiere un costoso entorno ultra-limpio como el que se requiere para la fabricación de un CI semiconductor. Las placas están hechas generalmente, además, de plástico reforzado, epoxi con fibra de vidrio, TEFLON®, poliimida, etc., en comparación con silicio o vidrio que se usan como sustratos para dispositivos microfluídicos microfabricados en la fabricación de semiconductores. Además, en lugar de un alineador de máscara de semiconductor, el alineamiento habitualmente puede realizarse de forma manual para el procesamiento de PCB. Se usan máscaras económicas hechas de transparencias o láminas de MYLAR en lugar de las costosas fotomáscaras de cromo sobre vidrio usadas en la fabricación de semiconductores. En el procesamiento de PCB, se perforan lagunas de tránsito (*via holes*) mecánicamente o con un láser y a continuación se electrochapan en lugar de grabarse y la deposición con vapor usados en el procesamiento de semiconductores que necesita procesamiento al vacío. Generalmente se obtienen múltiples capas de cableado se obtienen generalmente uniendo placas sencillas modeladas individualmente juntas en oposición al uso de un único sustrato y la acumulación de múltiples capas o unión de discos en la fabricación de un semiconductor. De forma amplia, éstas son las principales diferencias entre un proceso de fabricación de PCB y un proceso de fabricación de semiconductores, incluso aunque los procesos de PCB de alta calidad se mueven hacia la adopción de algunos de los procesos de semiconductores (tales como deposición física de vapor).

En el actual entorno comercial altamente competitivo, es imperativo que los productos lleguen al mercado de forma rápida y económica, particularmente en componentes electrónicos para el consumidor y empresas de diagnóstico médico. La presente materia se refiere a utilizar técnicas de fabricación de placas de circuito impreso (PCB) que son ampliamente disponibles, fiables, económicas y bien definidas. Al fabricar plataformas microfluídicas reconfigurables con una tecnología de fabricación fiable, fácilmente accesible y de bajo coste, el desarrollo y la aceptación de dispositivos de laboratorio en un chip para muchas aplicaciones potenciales en biomedicina y en otras áreas estarán más ampliamente extendidos y serán más rápidos.

El atractivo de la tecnología de PCB como un proceso de fabricación económico, bien establecido, flexible y fácilmente accesible para el desarrollo de sistemas microfluídicos ya ha sido reconocido por investigadores que trabajan con sistemas microfluídicos de flujo continuo más tradicionales. Por ejemplo, los investigadores han demostrado previamente una serie de dispositivos microfluídicos de flujo continuo en base a tecnología de PCB incluyendo un detector de burbujas, un sistema de regulación del pH, una microbomba y un sensor de presión capacitivo. Más recientemente, los dispositivos de PCB para la manipulación y el análisis de células únicas mediante dielectroforesis también se han descrito, dado que tienen enfoques híbridos en los que se usan una PCB para integrar de forma monolítica dispositivos microfluídicos a base de silicio. Sin embargo, sigue habiendo una necesidad percibida desde hace mucho de un sistema económico, flexible y reconfigurable para la manipulación en flujo discreto de gotitas.

Resumen

La presente invención se define mediante la reivindicación independiente 1.

Los aparatos y métodos, tal como se desvelan en este documento, comprenden una nueva manera de utilizar un sustrato fabricado en un proceso de placa de circuito impreso (PCB) convencional para manipulación de gotitas microfluídica digital. Este uso no convencional de procesos de PCB bien establecidos incorpora diversos nuevos aspectos incluyendo: (1) el uso de pistas y puntos de soldadura (*pads*) de cobre en una PCB como electrodos para la manipulación de gotitas en el que fluidos en forma de gotitas son enrutados (es decir, transportados) a las superficies externas de un sustrato de PCB mediante medios eléctricos (en oposición a la colocación de componentes electrónicos y el enrutamiento de señales electrónicas); (2) el uso de material de máscara de soldadura como electrodo dieléctrico para actuar como aislante para la manipulación de gotitas inducida por campo eléctrico (en oposición al uso de las máscara de soldadura, como su nombre indica, para proteger a los cables de cobre de la soldadura); (3) el uso de máscara de soldadura líquida o seca fotosensible para fabricar estructuras físicas para contener fluidos; (4) el uso de lagunas de tránsito en la PCB para conectar eléctricamente electrodos de control de gotitas entre sí o para poner en contacto puntos de soldadura; (5) el uso de lagunas de tránsito llenas de

máscara de soldadura interiores con respecto a los electrodos en la PCB para permitir el rellenado cercano de electrodos de control de gotitas; (6) el llenado de lagunas de tránsito interiores con respecto a los electrodos con epoxis conductoras para permitir el rellenado cercano de electrodos sin pérdida de área conductora de los electrodos; (7) el llenado de lagunas de tránsito interiores con respecto a los electrodos con epoxis ópticamente transparentes para mediciones ópticas a través de la gotita; (8) el uso de pistas de cobre adyacentes a los electrodos, en la misma superficie de la PCB para proporcionar un potencial de referencia común (disposición co-planar); (9) el uso de cobre embebido en los electrodos de control y en la parte superior de la capa dieléctrica para que sirvan como electrodos de referencia; (10) el uso de perforaciones en la PCB para establecer una interfaz fluidica para permitir la entrada y la salida de fluidos en/fuera de la PCB; y (11) el uso de tubos de cobre como elementos calefactores.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un aparato para manipular gotitas, comprendiendo el aparato:

(a) un sustrato de placa de circuito impreso que comprende una primera superficie lateral y una segunda superficie lateral;

(b) una serie de electrodos dispuestos sobre la primera superficie lateral del sustrato;

(c) una capa dieléctrica dispuesta sobre la primera superficie lateral del sustrato y modelada para cubrir los electrodos; y

(d) un selector de electrodos para crear de forma dinámica una secuencia de activación de los electrodos de la serie, con lo cual una gotita dispuesta en la primera superficie lateral del sustrato es manipulada eléctricamente,

en el que el sustrato de la placa de circuito impreso comprende una pluralidad de aberturas del sustrato definidas en su interior y que se extienden desde la primera superficie lateral del sustrato a la segunda superficie lateral del sustrato y cada electrodo comprende una abertura de electrodo, en el que cada abertura de electrodo está alineada con una de la pluralidad de aberturas de sustrato para definir una pluralidad de lagunas de tránsito a través del aparato.

En otra realización, se proporciona un aparato para manipular gotitas que incluye un sustrato de placa de circuito impreso que comprende una primera superficie lateral y una segunda superficie lateral. Una serie de electrodos impulsores se dispone sobre la primera superficie lateral del sustrato y una serie de uno o más elementos de referencia ajustables a un potencial de referencia común se dispone en relación al menos sustancialmente co-planar con la serie de electrodos impulsores. Una capa de sustancia dieléctrica se dispone en la primera superficie lateral del sustrato y está modelada para cubrir los electrodos impulsores. Un selector de electrodos también está incluido para crear de forma dinámica una secuencia de activación de los electrodos de la serie, con lo cual una gotita dispuesta en la primera superficie lateral del sustrato es manipulada eléctricamente.

En otra realización más, se proporciona un aparato para manipular gotitas que incluye un sustrato de placa de circuito impreso que comprende una primera superficie lateral y una segunda superficie lateral. Una serie de electrodos impulsores se dispone sobre la primera superficie lateral del sustrato y está provisto un elemento de referencia alargado que es sustancialmente paralelo y está separado de la primera superficie lateral del sustrato una distancia para definir un espacio entre el elemento de referencia y la primera superficie lateral del sustrato, en el que la distancia es suficiente para contener una gotita dispuesta en el espacio. Una capa de sustancia dieléctrica se dispone sobre la primera superficie lateral del sustrato y está modelada para cubrir a los electrodos impulsores. Un selector de electrodos también está incluido para crear de forma dinámica una secuencia de activación de los electrodos de la serie, con lo cual una gotita dispuesta en la primera superficie lateral del sustrato es manipulada eléctricamente.

En una realización adicional, se proporciona un aparato para manipular gotitas que incluye un primer sustrato de placa de circuito impreso que comprende una primera superficie lateral y una segunda superficie lateral, una serie de electrodos impulsores dispuestos sobre la primera superficie lateral del primer sustrato de placa de circuito impreso, y una capa de sustancia dieléctrica dispuesta sobre la primera superficie lateral del primer sustrato de placa de circuito impreso y modelada para cubrir a los electrodos impulsores. El aparato también incluye un segundo sustrato de placa de circuito impreso que comprende una primera superficie lateral y una segunda superficie lateral, siendo el segundo sustrato de placa de circuito impreso sustancialmente paralelo a y estando separado del primer sustrato de placa de circuito impreso una distancia para definir un espacio entre la segunda superficie lateral del segundo sustrato de placa de circuito impreso y la primera superficie lateral del primer sustrato de placa de circuito impreso, en el que la distancia es suficiente para contener una gotita dispuesta en el espacio. Una serie de electrodos impulsores y una serie de uno o más elementos de referencia se disponen sobre la segunda superficie lateral del segundo sustrato de placa de circuito impreso. El aparato también incluye un selector de electrodos para crear de forma dinámica una secuencia de activación de los electrodos de la serie, con lo cual una gotita dispuesta entre la primera superficie lateral del primer sustrato de placa de circuito impreso y la segunda superficie lateral del segundo sustrato de placa de circuito impreso es manipulada eléctricamente.

También están previstos métodos para mover a una gotita en relación con el aparato de la presente invención.

En un caso, un método para mover a una gotita incluye la etapa de proporcionar una gotita sobre una superficie de un sustrato de placa de circuito impreso. La superficie comprende una serie de electrodos y la gotita se dispone inicialmente sobre un primero de los electrodos y es adyacente a un segundo de los electrodos separados del primer electrodo por un primer espacio. El método incluye, además, la etapa de polarizar el primer electrodo a un primer voltaje y el segundo electrodo a un segundo voltaje diferente del primer voltaje, con lo cual la gota se mueve hacia el segundo electrodo.

En otro caso, un método para mover a una gotita incluye la etapa de proporcionar una gotita sobre una superficie de un sustrato de placa de circuito impreso. La superficie comprende una serie de electrodos impulsores y una serie al menos sustancialmente coplanar de uno o más elementos de referencia y la gotita se dispone sobre un primero de los electrodos impulsores. El método incluye, además, polarizar el primer electrodo impulsor para mover la gotita desde el primer electrodo impulsor a un segundo electrodo impulsor.

En un caso adicional, un método para mover a una gotita incluye la etapa de proporcionar una gotita entre una superficie de un sustrato de placa de circuito impreso y un elemento de referencia alargado sustancialmente paralelo a y separado de la superficie de la placa de circuito impreso. La superficie de la placa de circuito impreso comprende una serie de electrodos impulsores y la gotita se dispone sobre un primero de los electrodos impulsores. El método incluye, además, polarizar el primer electrodo impulsor para mover la gotita desde el primer electrodo impulsor a un segundo electrodo impulsor.

En un caso adicional más, un método para mover a una gotita incluye la etapa de proporcionar una gotita entre una superficie de un primer sustrato de placa de circuito impreso y una superficie de un segundo sustrato de placa de circuito impreso sustancialmente paralelo a y separado de la placa de circuito impreso. La primera superficie de la placa de circuito impreso comprende una serie de electrodos impulsores y la gotita se dispone sobre un primero de los electrodos impulsores, y la segunda superficie de la placa de circuito impreso comprende una serie de electrodos impulsores y una serie de uno o más elementos de referencia. El método incluye, además, la etapa de polarizar el primer electrodo impulsor para mover a la gotita desde el primer electrodo impulsor a un segundo electrodo impulsor.

En otro caso, un método para mover a una gotita en una serie de electrodos impulsores sobre la superficie de una placa de circuito impreso sin elementos de referencia físicamente distintos algunos, requiere que la gotita esté dispuesta sobre un primero de los electrodos impulsores y se mueva hacia un segundo o tercer electrodo impulsor. El método incluye, además, polarizar los segundo y tercer electrodos impulsores, de modo que la gotita será impulsada hacia o lejos de cualquier de los segundo o tercer electrodos debido a la no homogeneidad en el campo eléctrico aplicado entre ellos. En este caso, la gotita no puede moverse de forma gradual, es decir moviéndose desde un electrodo a su electrodo adyacente, sino que en su lugar la gotita puede moverse de forma continua en el gradiente de campo eléctrico no homogéneo hacia o lejos del electrodo de destino utilizando un fenómeno conocido como dielectroforesis.

También están previstos métodos para fusionar dos o más gotitas en una gotita y dividir una gotita en dos o más gotitas.

En un caso, un método para fusionar dos o más gotitas en una gotita incluye la etapa de proporcionar primera y segunda gotitas sobre una superficie de un sustrato de placa de circuito impreso. La superficie comprende una serie de electrodos en la que la serie de electrodos comprende al menos tres electrodos que comprenden un primer electrodo externo, un electrodo medio adyacente al primer electrodo externo y un segundo electrodo externo adyacente al electrodo medio. La primera gotita se dispone sobre el primer electrodo externo y es adyacente al electrodo medio, y la segunda gotita se dispone sobre el segundo electrodo externo y es adyacente al electrodo medio. El método también incluye seleccionar uno de los tres electrodos como electrodo de destino y seleccionar dos o más de los tres electrodos para activación y desactivación en base a la selección del electrodo de destino. El método incluye, además, activar y desactivar los electrodos seleccionados para mover una de las primera y segunda gotitas hacia la otra gotita o ambas de las primera y segunda gotitas una hacia la otra, con lo cual las primera y segunda gotitas se fusionan conjuntamente para formar una gotita combinada sobre el electrodo de destino.

En otro caso, un método para dividir una gotita en dos o más gotitas incluye la etapa de proporcionar una gotita de partida sobre una superficie de un sustrato de placa de circuito impreso. La superficie comprende una serie de electrodos, en la que la serie de electrodos comprende al menos tres electrodos que comprenden un primer electrodo externo, un electrodo medio adyacente al primer electrodo externo y un segundo electrodo externo adyacente al electrodo medio. La gotita de partida se dispone inicialmente sobre al menos uno de los tres electrodos y es adyacente a al menos otro de los tres electrodos. El método también incluye polarizar cada uno de los tres electrodos a un primer voltaje para situar la gotita de partida a través de los tres electrodos. El método incluye además polarizar el electrodo medio a un segundo voltaje diferente del primer voltaje para dividir a la gotita de partida en primera y segunda gotitas divididas, con lo cual la primera gotita dividida se forma sobre el primer electrodo externo y la segunda gotita dividida se forma sobre el segundo electrodo externo.

En otro caso más, un método para dividir una gotita en dos o más gotitas incluye la etapa de proporcionar una gotita de partida sobre una superficie de un sustrato de placa de circuito impreso. La superficie comprende una serie de electrodos, en la que la serie de electrodos comprende al menos tres electrodos que comprenden un primer

electrodo externo, un electrodo medio adyacente al primer electrodo externo, y un segundo electrodo externo adyacente al electrodo medio. La gotita de partida se dispone inicialmente sobre al menos uno de los tres electrodos y se solapa al menos parcialmente con al menos otro de los tres electrodos. El método también incluye polarizar el electrodo medio a un primer voltaje para situar a la gotita de partida, con lo cual la gotita de partida se solapa al menos parcialmente con los tres electrodos. El método incluye, además, polarizar el electrodo medio a un segundo voltaje y al menos uno de los primer y segundo electrodos externos a un tercer voltaje, los segundo y tercer voltajes diferentes del primer voltaje, para dividir la gotita inicial en primera y segunda gotitas divididas, con lo cual la primera gotita dividida se forma sobre el primer electrodo externo y la segunda gotita dividida se forma sobre el segundo electrodo externo.

Es, por lo tanto, un objeto de la presente invención proporcionar aparatos para fabricar y operar sistemas microfluídicos basados en gotitas en base a tecnología de placa de circuito impreso (PCB) convencional en los que las gotitas se mueven hacia la superficie de la PCB mediante aplicación de potenciales eléctricos a electrodos definidos en la PCB.

Habiéndose indicado anteriormente en este documento un objeto de la materia desvelada en el presente documento, y que se aborda total o parcialmente mediante la materia desvelada en el presente documento, otros objetos serán evidentes a medida que avanza la descripción cuando se toma junto con los dibujos adjuntos, tal como se describe de la mejor manera a continuación en este documento.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es una vista en planta superior y las figuras 1B-1D son vistas de perfil de una realización de la presente materia que representan una disposición estrictamente co-planar sobre una PCB con lagunas de tránsito llenas o sin llenar en los electrodos;

La figura 2A es una vista en planta superior y la figura 2B es una vista de perfil de una realización de la presente materia que representa una disposición sustancialmente co-planar sobre una PCB con lagunas de tránsito llenas o sin llenar en los electrodos;

La figura 3A es una vista en planta superior y la figura 3B es una vista de perfil de una realización de la presente materia que representa una disposición co-planar embebida sobre una PCB con lagunas de tránsito llenas o sin llenar en los electrodos;

La figura 4A es una vista en planta superior y la figura 4B es una vista de perfil de una realización de la presente materia que representa una disposición de placa paralela o bi-planar sobre una PCB con lagunas de tránsito llenas o sin llenar en los electrodos;

La figura 5 es una vista en perspectiva de una gotita situada sobre una densa serie de electrodos con lagunas de tránsito sobre una PCB para la manipulación de gotitas de acuerdo con la presente materia (los depósitos de líquido no se muestran);

La figura 6 es una fotografía que representa la parte frontal de un chip de PCB usado para ensayar el rendimiento de transporte de gotitas de diferentes formas y tamaños de electrodos impulsores de acuerdo con la presente materia;

Las figuras 7A-7D son fotografías que representan diversas formas de electrodo de acuerdo con la presente materia,

Las figuras 8A-8B son fotografías de una realización de la presente materia que representan vistas frontal y posterior, respectivamente, de un diseño de chip de PCB que presenta un transportador de gotitas trifásico y otras estructuras para dispensar, almacenar y mezclar gotitas;

Las figuras 9A-9B son fotografías de otra realización de la presente materia que representan vistas frontal y posterior, respectivamente, de un diseño de chip de PCB que presenta un transportador de gotitas trifásico y otras estructuras para dispensar, almacenar y mezclar gotitas;

La figura 10 es un gráfico que representa características de transporte de gotitas (frecuencia frente a voltaje umbral) de electrodos de 1,5 mm de diferentes formas de acuerdo con la presente materia;

La figura 11 es un gráfico que representa características de transporte de gotitas (frecuencia frente a voltaje umbral) de electrodos de 1,0 mm de diferentes formas de acuerdo con la presente materia;

La figura 12 es un gráfico que representa la estabilidad de voltaje del transporte de gotitas a lo largo del tiempo de acuerdo con la presente materia;

La figura 13 es un gráfico que representa requisitos de voltaje mínimos para el transporte de gotitas a una frecuencia de conmutación dada de acuerdo con la presente materia; y

Las figuras 14A-14D son fotografías que representan imágenes a intervalos de tiempo que demuestran el transporte y el mezclado de gotitas de acuerdo con la presente materia.

Descripción detallada

Una placa de circuito impreso (PCB), también llamada a veces una placa de cableado impreso (PWB), es un sustrato usado para interconectar componentes electrónicos usando puntos de soldadura y pistas conductoras modeladas sobre la superficie. Típicamente, las PCB se fabrican adhiriendo una capa de cobre sobre todo el sustrato, algunas veces a ambos lados, (conocido como crear una "PCB en blanco") a continuación retirando el cobre no deseado (por ejemplo, grabando en un ácido) después de aplicar una máscara temporal, dejando solamente las pistas de cobre deseadas. Las conexiones eléctricas ("vías") entre lados opuestos del sustrato pueden formarse perforando agujeros a través del sustrato de forma mecánica o con un láser y metalizando el interior de la perforación para proporcionar una conexión eléctrica continua entre los dos lados. Pueden crearse placas de múltiples capas uniendo conjuntamente sustratos procesados individualmente. Las líneas de electrodo en la capa de cobre se definen habitualmente grabando cobre a partir de una PCB en blanco en un proceso de sustractivo mientras que algunas fundiciones usan procesos semi-aditivos y completamente aditivos donde el cobre se acumula sobre el sustrato mediante electrochapado u otras técnicas.

Tal como se ha descrito anteriormente, la microfluídica digital es un enfoque microfluídico en el que gotitas discretas de fluido son manipuladas eléctricamente sobre un sustrato que contiene una serie de electrodos. En una configuración usada habitualmente, las gotitas están intercaladas entre dos placas paralelas donde la placa superior contiene físicamente las gotitas y la placa inferior contiene una serie de electrodos (o elementos) impulsores o de control dirigibles individualmente que están aislados eléctricamente. Típicamente, también se requieren uno o más electrodos (o elementos) de referencia para controlar el potencial eléctrico de la gotita. Los electrodos de referencia pueden estar provistos sobre el mismo sustrato que los electrodos impulsores (co-planares) o en una placa opuesta (bi-planares). El espacio entre las dos placas que rodean a la gotita está generalmente abierto y puede llenarse con aire o con un líquido inmiscible para impedir la evaporación. Los ejemplos de líquidos inmiscibles que pueden usarse con gotitas acuosas incluyen aceite de silicona, aceite de fluorosilicona o aceites de hidrocarburos. Cuando los electrodos de referencia y los electrodos impulsores están provistos sobre el mismo sustrato, la placa opuesta no sirve como parte del circuito eléctrico, sino que sirve solamente como placa de cubierta para contener físicamente los líquidos y puede que no se la requiera para el funcionamiento del dispositivo.

El movimiento de la gotita se consigue aplicando un potencial entre el electrodo de referencia y uno o más de los electrodos impulsores. El potencial aplicado puede ser CC o CA y no es necesario que los electrodos de referencia sean físicamente distintos de los electrodos impulsores. Una gotita adyacente a un electrodo de control activado será atraída hacia ese electrodo de control y se moverá hacia él. Los electrodos de control pueden activarse secuencialmente usando patrones definidos por el usuario (posiblemente usando un selector de electrodos) para transportar gotitas a lo largo de trayectorias arbitrarias definidas por electrodos de control contiguos. Además del transporte, otras operaciones incluyendo fusión, división, mezclado, deformación y dispensado de gotitas pueden realizarse en base al diseño de los electrodos de control y los patrones de activación.

Un procesador microfluídico digital está constituido esencialmente por una serie de electrodos de control con uno o más electrodos de referencia. Un chip completo puede incluir muchos otros tipos de estructuras incluyendo canales, depósitos de líquido, placas superiores, sensores, entradas, salidas, etc. La serie de electrodos requiere interconexiones para conectar eléctricamente algunos electrodos conjuntamente y para conectar electrodos a puntos de soldadura de contacto para la conexión a circuitos externos. Previamente, los chips microfluídicos digitales se fabricaban en sustratos de vidrio o silicio usando técnicas de deposición en película fina y fotolitografía tomadas de la fabricación de semiconductores. Se acumularon múltiples niveles de interconexión eléctrica para cableado depositando y modelando capas sucesivas de conductores y aislantes sobre un único sustrato de partida. La presente materia se refiere a aparatos y métodos con los cuales pueden construirse ventajosamente procesadores microfluídicos digitales en un proceso de PCB convencional en oposición a un proceso a base de vidrio o silicio a medida.

La materia desvelada en el presente documento aprovecha la facilidad con la que múltiples capas de conductores pueden generarse en un proceso de PCB frente a un proceso a base de vidrio o silicio. Éste es esencialmente el caso, dado que en el procesamiento de PCB las capas de metal se fabrican sobre sustratos diferentes que se laminan conjuntamente al final en lugar de acumularse secuencialmente sobre un único sustrato.

Los patrones de cableado del conductor se transfieren al sustrato de PCB mediante enchapado sustractivo, enchapado en paneles, enchapado en patrones o enchapado aditivo. Generalmente, se requerirán dos o más capas de cableado para operaciones de manejo de gotitas complejas que necesitan el uso de placas de múltiples capas. Las placas de múltiples capas se ensamblan uniendo varias placas de doble lado o mediante placas de acumulación/secuenciales que no requieren perforación mecánica de agujeros (por ejemplo, las lagunas de tránsito son grabadas químicamente o perforadas con láser y a continuación se enchapan sin electricidad). Por definición, las placas de doble lado tienen cableado en ambos lados de las placas que pueden clasificarse, además, en placas sin metalización de agujeros pasantes y placas con metalización de agujeros pasantes. Las placas con metalización de agujeros pasantes se clasifican además en metalización de agujeros pasantes enchapados y metalización de

agujeros pasantes llenos. En la metalización de agujeros pasantes enchapados, los agujeros se metalizan mediante cobrizado (por ejemplo, electrochapado o enchapado sin electricidad o una combinación de los mismos) y en metalización de agujeros pasantes llenos, los agujeros pueden llenarse con pastas conductoras tales como pasta de cobre, pasta de plata, epoxi conductora, etc.

5 En chips microfluídicos digitales, los agujeros pasantes (o lagunas de tránsito) se perforan a través del centro de los electrodos impulsores en un lado de una placa de múltiples capas para establecer conexiones eléctricas en el lado opuesto de la placa. La huella de una gotita se define por el área de un electrodo impulsor. Para obtener pequeños volúmenes de gotita, es necesario minimizar el área de los electrodos impulsores. Dado que las lagunas de tránsito se perforan a través de los electrodos impulsores, es importante minimizar el diámetro de las lagunas de tránsito
10 incluyendo el diámetro del punto de soldadura/tierra. Por lo tanto, las lagunas de tránsito desempeñan un papel importante en la definición de los mínimos volúmenes de gotitas obtenibles en un proceso de PCB. La industria de las PCB está reduciendo los tamaños de las lagunas de tránsito por una razón diferente que es evitar bloquear los canales de conducción de los cables y maximizar el área de superficie de la PCB disponible para las pistas. Muchos procesos de acumulación usan pequeñas vías que se forman perforando a través de usando un láser excimer. Existen una serie de variaciones de los procesos de acumulación usados en la industria de las PCB incluyendo,
15 aunque sin limitarse a, Circuitos Laminares Superficiales (SLC) donde las vías son fotoformadas; DYCOstrate™ donde las vías se graban con plasma seco en paralelo; Capa de Redistribución de Películas (FRL) donde el dieléctrico más externo es fotosensible mientras que las capas internas constituyen una placa de múltiples capas regular; Adhesivo Flexible Conductor Unido (Z-Link); Sistema Estructural de Acumulación (IBSS) donde el dieléctrico es fotosensible; Núcleos de Unión Secuencial/Laguna de Tránsito Interna de Cualquier Capa (ALIVH) donde se usa un láser de CO₂ para perforar las vías y los agujeros se llenan a continuación con pasta de plata; Circuitos Formados en Portadores donde circuitos diferentes se preparan sobre portadores de acero inoxidable y a continuación se laminan en un preimpregnado FR-4; Acumulación de láminas con rodillos donde láminas recubiertas de epoxi de lado único se laminan mediante calor y presión aplicados con rodillos; y Acumulación de Láminas que es similar a la
25 acumulación de láminas con rodillos pero se laminan circuitos de doble lado o de múltiples capas. En una realización del uso de una placa acumulada (Z-Link) para chips microfluídicos digitales, placas flexibles múltiples constituidas por láminas de cobre reforzadas con poliimida pueden laminarse conjuntamente y a continuación sobre una placa rígida para formar una placa de múltiples capas. En este caso, los agujeros en cada capa flexible pueden perforarse, perforarse con láser o perforarse con plasma. Los agujeros que interconectan diversas capas pueden llenarse a
30 continuación con adhesivo conductor.

REALIZACIONES GENERALES

En referencia a las figuras 1A-1D, 2A-2B, 3A-3B, 4A-4B y 5, los requisitos para adaptar sustratos procesados de PCB para la manipulación de gotitas se describirán a continuación con más detalle. Tal como se describirá con más detalle a continuación, las figuras 1A-1D se refieren a un chip microfluídico digital de PCB 10 que incluye una
35 disposición estrictamente co-planar sobre una PCB con lagunas de tránsito llenas o sin llenar en los electrodos; las figuras 2A-2B se refieren a un chip microfluídico digital de PCB 20 que incluye una disposición sustancialmente co-planar sobre una PCB con lagunas de tránsito llenas o sin llenar en los electrodos; las figuras 3A-3B se refieren a un chip microfluídico digital de PCB 30 que incluye una disposición co-planar embebida sobre una PCB con lagunas de tránsito llenas o sin llenar en los electrodos; las figuras 4A-4B se refieren a un chip microfluídico digital de PCB 40
40 que incluye una disposición de placa paralela o bi-planar sobre una PCB con lagunas de tránsito llenas o sin llenar en los electrodos; y la figura 5 representa una gotita situada sobre una densa serie de electrodos con lagunas de tránsito sobre una PCB para la manipulación de gotitas. La figura 5 muestra de forma general el concepto de la presente materia en el que muestras de líquido se digitalizan en gotita o gotitas discretas *D* que, a continuación, pueden dispensarse, transportarse, incubarse, detectarse o hacerse reaccionar con otras gotitas
45 independientemente (el enfoque de "microfluídica digital").

En cada una de las realizaciones mostradas en las figuras 1A-1D, 2A-2B, 3A-3B y 4A-4B, y tal como se describirá individualmente con más detalle a continuación, se proporciona una placa de sustrato de PCB 12, teniendo la placa una primera superficie lateral superior 13 y una segunda superficie lateral inferior 14. Electrodos (o elementos) de control impulsores 16, tales como electrodos impulsores de pistas de cobre, pueden proporcionarse sobre la
50 superficie superior 13 de la PCB 12, y electrodos (o elementos) de referencia 18, tales como electrodos de referencia de pistas de cobre o un electrodo de referencia de placa paralela, también pueden proporcionarse en diversas configuraciones para la manipulación de gotitas. Máscaras de soldadura, tales como una máscara de soldadura líquida fotosensible (LPI), se usan típicamente en procesos de PCB tradicionales como capa externa para proteger tubos de cobre de la acción de agentes de grabado o enchapado o de soldadura durante la colocación de
55 componentes electrónicos. Sin embargo, en su utilidad para impulsar gotitas de acuerdo con la presente materia, esta capa externa es un aislante 22 que sirve para aislar las gotitas de los potenciales aplicados sobre electrodos impulsores y de referencia 16, 18. Los electrodos impulsores 16 están completamente aislados por el aislante 22, preferiblemente una máscara de soldadura LPI o algún otro dieléctrico incluyendo máscaras de soldadura temporales. Aislamiento completo significa que el electrodo impulsor 16 está cubierto en todos los lados incluyendo los bordes. El aislante 22 (máscara de soldadura LPI) se aplica usando procesos convencionales que incluyen, aunque no se limitan a, recubrimiento por cortina, recubrimiento por centrifugado, recubrimiento por pulverización o recubrimiento de pantalla. En el caso en el que se necesita un electrodo de referencia 18, algunos de los elementos de cobre pueden dejarse desnudos y no aislarse para proporcionar un potencial de referencia directo a las gotitas.

Esta parte expuesta es lo más cercana a los electrodos impulsores **16** que permita el proceso de PCB que está definido por la resolución de los elementos de cobre así como la resolución de la máscara de soldadura y el registro de la capa de máscara de soldadura a la capa de cobre. La parte expuesta del electrodo de referencia **18** puede tener un acabado de superficie conductora opcional que habitualmente incluye plata por inmersión, oro por inmersión y níquel sin electricidad/oro por inmersión (ENIG).

Material del sustrato

Tal como se ha descrito anteriormente, los dispositivos microfluídicos electrostáticos de la presente materia incluyen una placa de sustrato **12** que puede fabricarse en casi cualquier material de placa que se usa habitualmente para la fabricación de PCB. Estos materiales incluyen, aunque no se limitan a, FR-2, FR-4, FR-5, poliimida, Kapton™, Rogers™, Duroid™, BT, ésteres de cianato y Politetrafluoroetileno (PTFE). Pueden usarse sustratos rígidos, rígidos-flexibles o flexibles como material de base **12** para la fabricación de estos dispositivos.

Formación del electrodo

La capa de cobre conductora más externa de la PCB está modelada para formar los electrodos impulsores requeridos para manipular gotitas líquidas mediante campos eléctricos. Los electrodos impulsores **16** pueden asumir una amplia diversidad de contornos y formas dependiendo de la aplicación particular. Por ejemplo, pueden usarse series de electrodos de forma cuadrada, series de electrodos de forma circular, series de electrodos de forma de hexágono, series de electrodos de forma de estrella y otras formas de electrodos entrelazadas o interdigitadas, así como estructuras de electrodo alargadas. Los electrodos de referencia **18** también pueden estar modelados en la misma capa conductora o en una capa conductora diferente sobre el mismo sustrato (co-planar) o pueden estar provistos sobre un sustrato diferente (bi-planar).

En una realización tal como se muestra en las figuras 1A-1D, los electrodos de referencia **18** pueden estar modelados en la misma capa de cobre conductora que los electrodos de control impulsores **16** en los que el aislante **22** se retira sobre partes de electrodos de referencia **18** para dejar expuesta la capa conductora subyacente. Este patrón permite contacto eléctrico simultáneo entre los electrodos de referencia **18** y la gotita de líquido. En esta realización, los electrodos de referencia **18** pueden estar ubicados adyacentes a o entre los electrodos de control impulsores **16**.

En otra realización, tal como se muestra en las figuras 2A-2B, los elementos de referencia **18** pueden estar formados como una capa conductora diferente modelada directamente sobre el aislante **22**. La capa conductora puede ser una fina película metálica depositada mediante procesamiento al vacío, enchapado no eléctrico, electrochapado, laminación u otros medios y modelarse para formar los elementos de referencia **18**. Los elementos de referencia **18** pueden asumir diversos contornos y formas y pueden estar directamente encima y/o al lado de los elementos impulsores **16** (es decir, no es necesario que los elementos de referencia **18** estén alineados de forma precisa con los elementos de control impulsores **16**). En una disposición, los elementos de referencia **18** pueden formar una rejilla o malla de tubos conductores superpuestos sobre elementos impulsores **16**. En esta disposición, los elementos de referencia **18** podrían proteger eléctricamente a los electrodos de control **16** donde se solapan, de modo que el solapamiento idealmente debería minimizarse cuando se dimensionan y se ubican los elementos de referencia **18** con respecto a los elementos de control impulsores **16**. En otra disposición, el espaciado de la rejilla se selecciona para ser inferior a, pero no un factor entero de, el espaciado del electrodo. Esta disposición de capa conductora diferente puede realizarse usando procesos de PCB con metal aditivos donde el metal se deposita sobre el aislante **22** o como alternativa podría realizarse usando procesos sustractivos donde los elementos de referencia **18** y los elementos impulsores **16** están formados sobre lados opuestos de un sustrato de circuito flexible fino. En este último caso, el sustrato de circuito flexible sirve como aislante para los elementos de control impulsores **16** y el circuito flexible puede laminarse a un sustrato rígido para proporcionar rigidez mecánica y para proporcionar interconexiones eléctricas para los electrodos.

En una realización adicional, tal como se muestra en las figuras 3A-3B, los elementos de referencia **18** pueden estar provistos en una disposición co-planar embebida dentro de los elementos de control impulsores **16**. En dicha disposición, las lagunas de tránsito **25** con enchapado **26** pueden funcionar como elementos de referencia **18** en áreas no cubiertas por el aislante **22**. Otras lagunas de tránsito **24** con enchapado **26** cubiertas por el aislante **22** también pueden proporcionarse y funcionar tal como se describe a continuación en este documento.

En otra realización, tal como se muestra en las figuras 4A-4B, los elementos de referencia **18** pueden estar provistos sobre un sustrato diferente como una placa paralela. Típicamente, el sustrato que contiene electrodos impulsores **16** y el sustrato que contiene elementos de referencia **18** se colocan opuestos entre sí con un espacio **G** entre ellos para contener los líquidos creando, de este modo, una estructura “en sándwich”. Una disposición de placa paralela adicional puede incluir dos superficies opuestas que son dispositivos microfluídicos de PCB electrostáticos en sí mismas (La “placa” superior puede ser una PCB que tiene una primera superficie lateral superior **13'** y una segunda superficie lateral inferior **14'**) y tienen elementos impulsores **16** en ambas superficies y elementos de referencia **18** en al menos una superficie.

Dado que se necesita muy poca corriente para cargar los electrodos impulsores **16** para manipulación de gotitas basada en un campo eléctrico, el material conductor que forma los electrodos puede ser sustancialmente más resistivo de lo que es típicamente aceptable para aplicaciones de PCB. Por lo tanto, puede usarse una amplia gama de diferentes tipos de conductores, además del cobre. Esto incluye conductores que típicamente se consideran inadecuados para formar puntos de soldadura y pistas en PCB. Análogamente, la capa conductora puede ser sustancialmente más fina de lo que es típicamente preferidos para PCB: Idealmente, la capa conductora debe ser lo más fina posible para minimizar la topografía de los elementos conductores que posteriormente deben cubrirse con la capa aislante. Adicionalmente, la minimización del grosor del conductor promueve la planeidad de la superficie de la PCB que es deseable para la manipulación consistente y fiable de gotitas sobre la superficie. El grosor del conductor puede minimizarse usando un material de sustrato de partida con un grosor conductor mínimo (por ejemplo, capa de ¼ oz. o 5 µm de revestimiento de cobre) o añadiendo una etapa de pulido o grabado para reducir el grosor de conductor antes de la deposición del aislante.

Interconexión y vías del electrodo

Las pistas conductoras sobre el sustrato de PCB **12** se usan para establecer conexiones eléctricas con los electrodos impulsores **16** y los elementos de referencia **18**. Cada electrodo impulsor **16** o elemento de referencia **18** puede estar conectado a uno o más electrodos impulsores **16** o elementos de referencia **18** diferentes, a otros componentes electrónicos en el mismo sustrato de PCB **12**, o a puntos de soldadura para conexión externa. En una disposición, los puntos de soldadura para la conexión externa están provistos a lo largo de un borde de la PCB y la PCB está adaptada para su uso en un receptáculo conector de borde de tarjeta **28** (véase las figuras 8A-8B). En otra disposición, una serie de puntos de soldadura se dispone sobre la superficie de la PCB y se establece contacto con los puntos de soldadura usando clavijas accionadas por resorte, clips de prueba o una tira de material conductor de forma anisótropa **29** (véase la figura 9A). En otra disposición más, un conector de clavijas, conector de receptáculo u otro componente electrónico discreto está conectado a la PCB para facilitar la conexión a un circuito externo.

Tal como se muestra en las figuras 1A-1D, 2A-2B, 3A-3B y 4A-4B, las conexiones eléctricas entre diferentes capas conductoras de sustrato **12** pueden establecerse mediante métodos de PCB tal como se conocen en la técnica, con lo cual un agujero o laguna de tránsito **24** es perforado a través del sustrato **12** desde las dos regiones conductoras (superficie superior **13** y superficie inferior **14**) en cualquier lado del sustrato **12** y que deben conectarse eléctricamente. Aunque se muestran como círculos en los dibujos, se entiende que las lagunas de tránsito **24** pueden ser de cualquier forma tal como cuadradas, ovales, etc., que pudiera formarse en el material de sustrato **12**. El interior del agujero **24** también puede metalizarse mediante enchapado no eléctrico o electrochapado o usando otros métodos para formar un enchapado **26** (metalización de agujero pasante enchapado) de modo que se establece una continuidad eléctrica entre los dos lados opuestos en la ubicación de la laguna de tránsito. Tal como se ha descrito anteriormente, las pastas conductoras (metalización de agujeros pasantes llenos) también podría usarse en lugar de metalización de agujeros pasantes enchapados para establecer la continuidad eléctrica.

Para establecer conexiones eléctricas entre electrodos y pistas están disponibles varios enfoques. En un enfoque, un cable o pista se aleja del electrodo en el mismo lado de la PCB, el cable puede enrutarse a continuación si fuera necesario a través del sustrato en una ubicación de vía alejada del electrodo. En otro enfoque, se realizan vías en los electrodos. En este caso puede ser necesario proporcionar medios para llenar o cubrir la perforación para impedir que el líquido entre o se evapore a través de la perforación de tránsito. La laguna de tránsito **24** puede cerrarse mediante enchapado usando enchapado no eléctrico o electrochapado o puede llenarse o cubrirse usando diversas técnicas y diversos materiales (epoxi conductora, epoxi no conductora, epoxi transparente o cualquier otro material). Después de llenar las lagunas de tránsito con cualquiera de estos materiales de llenado, la superficie de la PCB puede cubrirse a continuación con cobre mediante enchapado no eléctrico o electrochapado para ocultar completamente la laguna de tránsito a las gotitas que se mueven sobre la superficie.

En un enfoque, el agujero se hace lo suficientemente pequeño de modo que se evita que un aislante depositado en forma líquida, tal como un material de máscara de soldadura líquida tradicional, penetre en el agujero mediante efectos de viscosidad o tensión superficial, o podría hacerse lo suficientemente grande de modo que la máscara de soldadura líquida pueda entrar en la laguna de tránsito, formando de este modo una laguna de tránsito llena de máscara de soldadura **24'** (véase la figura 1B). Como alternativa, puede añadirse una etapa del proceso extra para llenar las perforaciones con una epoxi o material similar antes de depositar el aislante, formando de este modo una laguna de tránsito llena de epoxi **24''** (véase la figura 1C), o una laguna de tránsito llena de epoxi transparente **24'''** (véase la figura 1D). Otro enfoque es usar un material aislante de película seca que "recubre" la perforación, cubriéndola eficazmente y sellando la superficie del chip. Una posible desventaja de varios de estos enfoques es que da como resultado la formación de una región no conductora en el borde del, en caso contrario, electrodo conductor que reduce el área de ese electrodo que puede usarse para la generación del campo eléctrico. Para abordar este problema, varias técnicas están disponibles para producir un relleno conductor, incluyendo el uso de epoxis conductoras para llenar el agujero y el uso de enchapado no eléctrico o electrochapado para proporcionar un recubrimiento de superficie conductor sobre un método de relleno no conductor. Otra alternativa es electrochapar la perforación de modo que se vuelva completamente llena de metal. Este enfoque puede requerir una etapa de planarización para retirar el exceso de metal depositado sobre la superficie del sustrato mediante la mayor cantidad de electrochapado. La planarización y el control del grosor del conductor sobre la superficie del sustrato pueden simplificarse en este caso mediante el uso de un proceso de "enchapado en botones" en el metal adicional se añade

solamente en la región que rodea a la vía. Los “botones” resultantes pueden retirarse a continuación puliendo la superficie de la PCB. En este método, cantidades sustanciales de metal pueden depositarse dentro de las perforaciones sin aumentar el grosor final del metal sobre la superficie de la PCB.

Aislamiento del electrodo

- 5 En referencia, además, a las figuras 1A-1D, 2A-2B, 3A-3B y 4A-4B, los electrodos impulsores **16** están típicamente aislados eléctricamente por el aislante **22** para impedir el flujo de corriente eléctrica directa entre los electrodos y el líquido conductor cuando se aplica un potencial de CC a los electrodos impulsores. Debe observarse que también podrían aplicarse potenciales de CA a los electrodos impulsores para permitir la manipulación de gotitas inducida por un campo eléctrico. Aunque puede usarse cualquier dieléctrico, la máscara de soldadura se usa típicamente en procesos de PCB tradicionales para proteger a los tubos de cobre sobre una PCB y para dejar expuesto al cobre solamente donde los componentes electrónicos se suelden eventualmente. El enfoque más directo para aislar los electrodos impulsores **16** es usar material de máscara de soldadura (u otro dieléctrico) como aislante eléctrico **22**. Las máscaras de soldadura tanto líquidas como de película seca son adecuadas para su uso como aislantes de electrodos **22**. Generalmente se prefieren máscaras de soldadura fotosensibles, dado que pueden modelarse fácilmente para proporcionar acceso eléctrico a los elementos de referencia **18** o puntos de soldadura de contacto debajo del aislante **22**.

- Las máscaras de soldadura están disponibles en dos variedades: máscara de soldadura líquida fotosensible (LPI) o de película seca (DFSS). La LPI no es conforme. La DFSS ofrece paredes laterales casi verticales y se ha descrito para fabricar moldes de electrochapado, sellar canales fluidicos y como máscara para tratamiento: con chorro de polvo “*powderblasting*” de microcanales. Sin embargo, la DFSS no se ha usado para formar depósitos líquidos o como un material de junta para proporcionar un separador o sello entre dos placas paralelas tal como se prevé en la presente materia.

- En algunas aplicaciones, los materiales de máscara de soldadura pueden no existir con la combinación deseada de propiedades térmicas, mecánicas, eléctricas u ópticas. En estos casos, los materiales de la máscara de soldadura pueden sustituirse por o combinarse con otros tipos de materiales aislantes. Por ejemplo, materiales desechables tales como poliimida, materiales que pueden recubrirse por inmersión o mediante centrifugado o mediante pulverización o mediante cepillado tales como TEFLON® AF y Cytop™, materiales depositados por vapor o de pulverización catódica tales como dióxido de silicio, y polímeros tales como parileno pueden aplicarse al sustrato de PCB.

- 30 Como alternativa a las máscaras de soldadura para el aislante **22**, podría depositarse una fina capa de parileno en un proceso de deposición de vapor física (PVD) como dieléctrico. Parileno es el nombre genérico para una familia de polímeros de poli(para-xilileno) que incluye parileno C, D, y N. Tal como se usa en esta descripción, parileno se refiere a cualquier composición de poli(para-xilileno) y mezclas de las mismas. Una ventaja fundamental con el parileno es que puede depositarse como una capa conforme y a un grosor mucho menor que tanto LPI como DFSS.
- 35 En métodos de PCB, la LPI puede formar un recubrimiento de una finura de hasta 0,5 mils (1 mil = 25,4 µm) mientras que el parileno sin agujeros puede formar un recubrimiento de una finura de hasta 0,5 µm. Dicha capa aislante fina reduce el potencial requerido para el impulso de gotitas. En algunas aplicaciones, el dieléctrico tendrá que modelarse para dejar expuestos a los electrodos de cobre. El parileno puede modelarse mediante grabado iónico reactivo, calcinación por plasma, grabado químico o mediante ablación por láser. Como alternativa, el parileno también puede depositarse selectivamente enmascarando las regiones que es necesario dejar expuestas mediante una cinta (por ejemplo, 3M® Mask Plus II Water Soluble Wave Solder Tape No. 5414 que se usa para enmascarar conectores dorados en PCB durante soldadura por ola). Otros ejemplos representativos de materiales que podrían usarse como dieléctricos incluyen siliconas, poliuretanos, acrílicos y otros dieléctricos que pueden formar recubrimiento mediante centrifugado o depositables.
- 40
- 45 Generalmente, es deseable minimizar el grosor del aislante **22** para reducir el voltaje requerido para el movimiento del líquido.

Capas de separador

- También está previsto que capas adicionales de material de máscara de soldadura puedan depositarse y modelarse para crear estructuras físicas sobre la superficie de la PCB tales como pocillos y canales (no se muestran) para su uso para reunir o dirigir el flujo de líquido.

PROCESOS ADICIONALES

Combinación de procesamiento sustractivo y aditivo

- En una realización adicional, puede usarse una combinación de procesos sustractivos y aditivos para fabricar placas de manipulación de gotitas de PCB de la presente materia. Pueden usarse procesos sustractivos para fabricar una placa de múltiples capas que define todo el enrutamiento eléctrico e interconexiones a los electrodos de control de gotitas. Una capa dieléctrica modelable puede aplicarse a continuación. Pueden modelarse vías en esta capa dieléctrica mediante perforación por láser o fotoenmascarado. En una realización, puede usarse LPI como

dieléctrico. El punto de soldadura del electrodo expuesto en el agujero puede estar opcionalmente enchapado para hacerla planar con la superficie dieléctrica. En este punto, puede usarse un proceso aditivo para definir todos los electrodos usando cobricación no eléctrica, dado que podría obtenerse una separación de tubos más pequeña.

Post-procesamiento

- 5 Un dispositivo acabado puede incluir una combinación de procesos de PCB convencionales y procesos no convencional. Por ejemplo, un recubrimiento hidrófobo de una etapa puede aplicarse a una PCB acabada para facilitar el transporte de gotitas. Además el uso de máscara de soldadura como dieléctrico podría no ser deseable para algunas aplicaciones, en las que las PCB no aisladas con una carcasa podrían recubrirse posteriormente con materiales de especialidad no disponibles en un proceso de PCB convencional. Sin embargo, en tales casos, el uso de una PCB como sustrato de partida y procesos de PCB para formar las pistas conductoras sigue proporcionando muchos, si no la mayoría, de los beneficios de un proceso completamente compatible con PCB.

- 15 En una realización, todos los tubos conductores requeridos para el enrutamiento eléctrico pueden fabricarse sobre una PCB de múltiples capas. Parte o toda la capa externa de cobre puede retirarse a continuación mediante pulido o grabado químico. Esta PCB, que contiene todo el cableado eléctrico requerido para la manipulación de gotitas, puede servir a continuación como sustrato para procesamiento adicional para modelar electrodos impulsores y de referencia con separación de tubos más fina. Para obtener separación de tubos más fina, los electrodos de control pueden modelarse usando técnicas de procesamiento de semiconductores incluyendo deposición en película fina y fotolitografía.

Enchapado de elementos de referencia coplanares

- 20 En una realización donde los electrodos de referencia 18 también están modelados en la misma capa que los electrodos impulsores 16 (véase, por ejemplo, las figuras 1A-1D), puede haber una depresión significativa en la máscara de soldadura LPI dado que solamente cubre los electrodos impulsores y deja los electrodos de referencia abiertos. Esta depresión podría afectar a la fiabilidad de funcionamiento dado que la gotita puede no estar en contacto con el elemento de referencia. En este caso, los electrodos de referencia pueden enchaparse de modo que la superficie del elemento de referencia sea planar con la máscara de soldadura LPI (no se muestra). Esta etapa de enchapado podría realizarse antes del acabado de la superficie con cobre o níquel.

Electrodos de referencia en la superficie externa

- 30 En una realización, después de que todos los electrodos de cobre se han formado tal como se ha descrito anteriormente en este documento, el recubrimiento de LPI puede usarse a continuación como dieléctrico internivel y otra capa de cobre puede modelarse sobre la LPI para servir como electrodos de referencia. El dieléctrico también puede ser una fina (2 mil o menos) placa PCB preimpregnada en una construcción típica de múltiples capas o podría ser una placa flexible con elementos de cobre para servir como electrodos de referencia sobre la capa más externa. La capa de cobre justo debajo de esta capa de cobre más externa tiene elementos de cobre que definen los electrodos impulsores.

- 35 *Integración de componentes electrónicos y detección sobre la PCB*

- 40 En una realización adicional, está previsto que la PCB de la presente materia también pueda estar constituida por componentes electrónicos en las áreas que no se usan para la manipulación de líquidos. Los componentes electrónicos pueden incluir microcontroladores, relés, multiplexores de alto voltaje, convertidores de voltaje (CC-CC para fijar el voltaje, CC-CA, CA-CC, etc.), elementos electro-ópticos tales como LED, fotodiodos, tubos fotomultiplicadores (PMT), elementos calefactores, termistores, dispositivos de resistencia a temperatura (RTD) y otros electrodos para mediciones electroquímicas. También pueden usarse pistas de cobre para mediciones de impedancia de las gotitas. Los elementos calefactores resistivos se realizan haciendo serpentear pistas de cobre y las características calefactores resistivas dependerán de las dimensiones de los tubos de cobre. En una realización, una PCB que contiene un detector óptico, tal como un PMT o un fotodiodo, puede usarse como placa paralela para formar un "sándwich" con la placa PCB de manipulación de gotitas. En otra realización, pueden usarse electrodos recubiertos de oro obtenidos en un proceso de PCB convencional, para mediciones electroquímicas.

Perforaciones para entrada/salida fluidica

- 50 Agujeros perforados mecánicamente en una PCB se usan típicamente para pegar o fijar la placa a otra superficie. Está previsto, además, en el chip microfluídico de PCB de la presente materia que estas perforaciones puedan usarse para servir como orificios de entrada/salida fluidica para la adición y la retirada de líquidos a o de la superficie del sustrato de PCB. Está previsto, además, que estas perforaciones puedan acoplarse con una fuente de líquido incluyendo, aunque sin limitarse a, tubos flexibles, jeringas, pipetas, tubos capilares de vidrio, tubo intravenoso o luz de microdiálisis. El líquido en estos tubos puede ser impulsado por presión o cualquier otro medio. Un flujo continuo de líquido desde los tubos puede establecer comunicación con la PCB a través de estas perforaciones que puede separarse en gotitas directamente desde el flujo o a través de un depósito intermedio en la PCB.

- 55

Por ejemplo, en una realización, perforaciones metalizadas (véase, por ejemplo, las perforaciones **32** en las figuras 9A-9B) pueden estar ubicadas adyacentes a electrodos de control para servir como orificios de entrada/salida fluidica para colocar retirar líquidos en la superficie del electrodo. En otra realización, perforaciones no metalizadas (véase, por ejemplo, perforaciones **34** en las figuras 9A-9B) pueden estar provistas para entrada y salida fluidica y pueden estar conectadas a un canal grabado en la máscara de soldadura que, a continuación, conduce a un depósito (no se muestra). Este depósito puede tener electrodos para dispensar, tal como usando técnicas de dispensado de gotitas mediado por campo eléctrico. En otra realización más, perforaciones metalizadas provistas para entrada/salida fluidica pueden estar cubiertas por un dieléctrico y además tener anillos concéntricos de electrodos alrededor de la perforación. En este caso, las gotitas pueden dispensarse radialmente fuera del agujero presurizando el líquido a través del agujero y a continuación usando un campo eléctrico para dispensar las gotitas sobre los electrodos. En una realización adicional, pueden usarse perforaciones para expulsar líquido a un depósito de desecho o cualquier otro contenedor fuera del chip recogiendo las gotitas en toda el área y permitiendo que las gotas caigan por gravedad en un contenedor colocado debajo del agujero.

Extracción de gotitas fuera del plano desde las lagunas de tránsito

Generalmente, las gotitas movidas en aparatos de la presente materia se manipulan en un plano horizontal en una estructura en sándwich con una o ambas de las placas comprendiendo PCB. En una realización adicional, los agujeros perforados en una PCB podrían usarse para extraer gotitas de la estructura en sándwich en un plano vertical. Las gotitas pueden extraerse a través de los agujeros de diversas maneras. En un método que explota la diferencia de presión entre una gotita confinada en una estructura en sándwich y un agujero grande, las gotitas podrían ser empujadas de forma pasiva a través de un agujero con un diámetro mayor que el radio de la gotita simplemente situándolo debajo del agujero. Las gotitas también podrían extraerse mediante medios eléctricos donde otra placa se añade a la estructura en sándwich y las gotitas pueden ser arrastradas fuera de una estructura en sándwich a la recién formada estructura en sándwich aplicando un potencial eléctrico. En este caso, para simplificar el proceso de extracción, una estructura en sándwich puede formarse entre un sustrato de PCB coplanar y otros sustrato con electrodos. Aunque ambas de estas placas forman una disposición de placas paralelas, las gotitas tocarán solamente el sustrato de PCB coplanar y se moverán verticalmente sobre el otro sustrato cuando se aplica un potencial eléctrico sobre el otro sustrato para arrastrar de forma electrostática a la gotita fuera del plano. La gotita también podría moverse verticalmente con la gravedad para estamparse sobre otra placa. Las aplicaciones para dicho impulso vertical de gotitas incluyen aplicaciones de estampado de ADN o proteínas. Las gotitas extraídas de dichos agujeros también pueden usarse para aumentar la longitud de la trayectoria para mediciones de absorbancia y para el transporte a otra estructura en sándwich para permitir el transporte a otra capa.

Síntesis bioquímica y análisis

Una serie de reacciones bioquímicas pueden realizarse mediante la manipulación de líquidos sobre sustratos de PCB tal como se desvela en la presente materia. Tal como se desvela en este documento, la presente materia proporciona un aparato para detectar un analito diana en soluciones de muestra mediante medios de detección eléctricos y ópticos. La solución de muestra puede comprender cualquier número de elementos, incluyendo, aunque sin limitarse a, fluidos corporales (incluyendo, aunque sin limitarse a, sangre, sudor, lágrimas, orina, plasma, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, semen, de virtualmente cualquier organismo, prefiriéndose las muestras de mamíferos y prefiriéndose particularmente muestras humanas); muestras de alimentos y ambientales (incluyendo, aunque sin limitarse a, muestras de aire, agrícolas, de agua y de suelo); muestras de agentes de guerra biológica; muestras de investigación; muestras purificadas, tales como ADN genómico purificado, ARN, proteínas, células, etc.; y muestras en bruto (bacterias, virus, hongos, etc.). Los tipos de ensayo que pueden realizarse sobre el sustrato de PCB tal como se desvela en este documento incluyen ensayos enzimáticos, amplificación de ADN isotérmicamente o mediante termociclado, inmunoensayos, incluyendo disposiciones en sándwich y homogéneas, y ensayos basados en células con medios de detección ópticos y eléctricos. Los analitos medidos en las muestras fisiológicas incluyen metabolitos, electrolitos, gases, proteínas, hormonas, citoquinas, péptidos, ADN y ARN.

En un proceso que usa el aparato de la invención, una muestra fisiológica humana puede introducirse en un depósito en la PCB. El depósito podría estar definido por la máscara de soldadura de película seca. La muestra puede dispensarse a continuación en gotitas que se mezclarán con las gotitas de reactivo apropiado provistas sobre la PCB o introducirse sobre la PCB. Algunos de los ensayos enzimáticos pueden monitorizarse a continuación ópticamente (por ejemplo, mediante absorbancia, reflectometría, fluorescencia y luminescencia). En el caso de la absorbancia, las lagunas de tránsito pueden llenarse con un material ópticamente transparente de modo que la luz pueda pasar a través de una gotita situada sobre una de estas lagunas de tránsito para mediciones de absorbancia.

En otro proceso, también pueden sintetizarse muestras bioquímicas en un sustrato de PCB usando técnicas de manipulación de gotitas descritas en este documento. Por ejemplo, en la PCB, pueden dispensarse una serie de gotitas de proteínas desde un depósito y mezclarse con diferentes reactivos e incubarse para descubrir automáticamente condiciones para cristalizar una proteína.

Transporte en la pared lateral

En un proceso adicional, pueden usarse pistas de cobre con grosores del mismo orden que la altura de la gotita, de modo que la gotita esté contenida entre las pistas dispuestas sobre el mismo sustrato y cubierta por un aislante. La gotita es impulsada mediante campos eléctricos aplicados principalmente en el plano del sustrato en lugar de perpendicular a éste. A diferencia de la disposición coplanar, donde la gotita se asienta sobre los electrodos impulsores y de referencia coplanares y la disposición de placas paralelas, en la que la gotita está intercalada entre los electrodos impulsores sobre un sustrato y un electrodo de referencia común sobre un sustrato paralelo, en esta estructura una gotita está intercalada entre los electrodos impulsores y de referencia coplanares.

REALIZACIÓN ESPECÍFICA

Aunque anteriormente en este documento se han descrito realizaciones generales de la presente invención, a continuación se describirán realizaciones más específicas de fabricación de un aparato para manipular muestras e líquido de micro-volumen en las que el aparato comprende un sustrato de placa de circuito impreso.

En una realización preferida, un sustrato FR-se lamina con una lámina de cobre de ¼ Oz (~9 µm) en ambos lados. Se perforan lagunas de tránsito de 8 mil a través del sustrato. Estas lagunas de tránsito se electrochapan a continuación con cobre y se llenan con máscara de soldadura o una epoxi. Preferiblemente, las lagunas de tránsito se enchapan en botón a un grosor de aproximadamente 5 µm donde las lagunas de tránsito se enchapan específicamente mientras que el resto de la placa está cubierto por una máscara. Los botones se planarizan mecánicamente y a continuación las lagunas de tránsito se llenan con máscara de soldadura o una epoxi no conductora. Después de procesar las lagunas de tránsito, se realiza una etapa de enchapado liso se realiza a un grosor de menos de 5 µm. En caso de que se requieren lagunas de tránsito no llenas, puede realizarse otra etapa de perforación para obtener agujeros no unificados y el enchapado se realiza si fuera necesario. En esta fase, el patrón de electrodo diseñado es transferido al cobre con una separación de tubos mínima de 2 mils grabándolo a través de una máscara. La LPI se modela y se recubre a un grosor de aproximadamente 0,5 mils. Finalmente, una máscara de soldadura de película seca se lamina y se modela para formar las estructuras físicas (por ejemplo, pocillos y/o canales) para contener líquidos y también para servir como material de separación. En otras realizaciones, la capa de separación también puede obtenerse usando uno o más recubrimientos de máscara de soldadura LPI o laminando y grabando una lámina de cobre.

ENSAYOS EXPERIMENTALES Y RESULTADOS

Se realizaron experimentos en los que un diseño de placa única de dos capas para un manipulador de gotitas mediado por un campo eléctrico tal como se desvela en este documento se sometió a un fabricante de PCB electrónicos disponible en el mercado y se ensayó. El diseño estaba constituido por series de diferentes formas de electrodo de control para el transporte y el mezclado de gotitas de líquido así como formas de electrodo especializadas para el dispensado de gotitas desde un volumen líquido mayor. Los electrodos se conectaron a puntos de soldadura de contacto mediante pistas conductoras modeladas en la misma capa de cobre sobre la superficie de la PCB. Donde era necesario, las pistas se enrutaron entre los dos lados de la placa usando vías convencionales en ubicaciones a distancia de los electrodos de control. Se ensayaron varios diseños de chip y esquemas de interconexión diferentes.

Algunos chips contenían múltiples copias de una única serie lineal de electrodos donde los elementos correspondientes en cada copia de la serie estaban conectados a la misma señal eléctrica - por lo tanto múltiples series idénticas podrían controlarse simultáneamente. Otros chips contenían un "bus" de electrodos o estructura transportadora donde cada cuarto electrodo en una línea contigua de electrodos de control estaba conectado a la misma señal de control. El uso de dicha estructura permite que trayectorias de transporte arbitrariamente largas sean controladas usando un número fijo de señales de control. Múltiples gotitas pueden desviarse sobre o fuera del bus y transportarse de forma sincrónica. Los puntos de soldadura de contacto se disponían a lo largo del lado de la PCB y estaban diseñadas para establecer contacto con ellas usando un conector de borde de tarjeta convencional o un clip de prueba SOIC convencional.

Las figuras 6, 7, 8A-8B y 9A-9B ilustran varios ejemplos de chips fabricados con fines experimentales. La figura 6 ilustra la parte frontal de un chip de PCB usado para ensayar el rendimiento del transporte de gotitas de diferentes formas (circular **16a**, cuadrada **16b**, de estrella con una pequeña curvatura **16c**, de estrella con una gran curvatura **16d**) (véase la figura 7) y tamaños de los electrodos de control (resultados descritos en referencia a las figuras 10-12 a continuación). El chip ilustrado en la figura 6 contiene 16 diferentes series de electrodos lineales. Las figuras 8A y 8B son vistas frontal y posterior de un diseño de chip que presenta un transportador de gotitas trifásico así como otras estructuras para el dispensado desde un depósito en el chip, el almacenamiento y la mezcla de gotitas. Las vías **24** se usan para enrutar las señales eléctricas desde la parte posterior de la PCB a los electrodos de control en la parte frontal y el contacto eléctrico se establece a través del receptáculo conector del borde de tarjeta **28** situado a lo largo de un lado de la PCB. La figuras 9A y 9B son vistas frontal y posterior de otro diseño de chip que presenta un transportador de gotitas trifásico así como otras estructuras para el dispensado desde un orificio de entrada/salida fluidica **32**, el almacenamiento y la mezcla de gotitas. Las vías **24** se usan para enrutar las señales eléctricas desde la parte posterior de la PCB a los electrodos de control en la parte frontal y el contacto eléctrico se establece mediante una serie de puntos de soldadura diseñados para establecer contacto con ellos usando un clip de prueba SOIC **29**.

Las series de los electrodos de control se diseñaron con un espaciado de 1,0 mm o 1,5 mm y una separación nominal de 2 mil entre electrodos adyacentes. El material del sustrato era FR-4 con un revestimiento de cobre de ¼ oz. El cobre se modeló para formar los electrodos de control, las pistas y los puntos de soldadura de contacto. La anchura de los tubos/separación mínima nominal del proceso usado era de 2 mil/2 mil, que era la separación usada entre electrodos adyacentes así como la anchura de pista entre los electrodos de control y los puntos de soldadura de contacto. Un material de máscara de soldadura fotosensible líquida, CARAPACE® EMP 110 (disponible de Electra Polymers & Chemicals, Ltd.) se usó como aislante del electrodo. El grosor nominal del aislante de máscara de soldadura era de 0,6 mil. Después de que las PCB fueran recibidas del fabricante, un fino recubrimiento hidrófobo de TEFLON® AF se aplicó a la superficie superior del chip. El TEFLON® AF se aplicó mediante recubrimiento por centrifugado de una solución al 1% en FC-75 a 3000 rpm durante 20 segundos sobre la superficie de la PCB, seguido por un curado de 30 minutos a 150°C.

Las PCB se ensamblaron como un sándwich con una placa superior de vidrio recubierta de óxido de indio-estaño. La placa superior también se recubrió con una fina capa de TEFLON® AF de modo que todas las superficies interiores en contacto con la gotita fueran hidrófobas. La película de óxido de indio-estaño conductora en la placa superior se usó como electrodo de referencia. La PCB y la placa superior estaban separadas por un espacio de aproximadamente 0,8 mm. Una o más gotitas de electrolito (KCl 0,1 M) se inyectaron en la estructura en sándwich y se depositaron sobre un electrodo de control. El volumen de las gotitas era suficiente para cubrir un único electrodo y era de aproximadamente 2,2 µl para los electrodos de 1,5 mm de espaciado y 1,1 µl para los electrodos de 1 mm. El volumen restante entre las dos placas se llenó con aire o con aceite de silicona de baja viscosidad (1 cSt.).

En referencia a las figuras 6, 7 y 10-12, se realizaron ensayos sobre el transporte de gotitas mediante activación secuencial de los electrodos de control tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 6.911.132 y la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2004/0058450, ambas de Pamula et al. Usando una PCB similar a la mostrada en la figura 6, se realizaron ensayos en 4 formas de electrodo diferentes (circular **16a**, cuadrada **16b**, de estrella con pequeña curvatura **16c**, de estrella con una mayor curvatura **16d**) (véase la figura 7) en cada uno de los tamaños de electrodo (1,0 mm y 1,5 mm de espaciado).

Para cada tamaño y forma de electrodo, la velocidad máxima a la cual las gotitas podían transportarse entre electrodos de control adyacentes se determinó en función del voltaje aplicado, tal como se muestra en las figuras 10 y 11. Las gotitas fueron transportadas con éxito a voltajes inferiores a 40 V (para un tamaño de electrodo de 1,0 mm) con la velocidad de transporte aumentando con el voltaje más allá de ese umbral. Se requerían voltajes mayores para el impulso de las gotitas que los descritos anteriormente en otros sistemas debido al uso del aislante de máscara de soldadura más grueso. Por ejemplo, el aislamiento de la máscara de soldadura es aproximadamente 16 veces más grueso que el aislamiento usado con dispositivos microfabricados anteriores y, por lo tanto, se requiere aproximadamente cuatro (4) veces el voltaje debido a la dependencia de la energía electrostática ($1/2 CV^2$) del mecanismo de transporte.

Tal como se esperaba, más allá del voltaje umbral inicial, la velocidad de transporte y, por consiguiente, la velocidad máxima a la que la gotita podía intercambiarse aumentaba con el voltaje. El intervalo de voltaje ensayado era de alrededor de 0 - 200 V para los electrodos de 1,5 mm y de 0 - 100 V para los electrodos de 1,0 mm, y se observaron tasas de transporte de gotitas de hasta 24 Hz. Las curvas de ensayo resultantes mostraban una forma general esperada - cuanto mayor era el voltaje aplicado, mayor era la frecuencia de transferencia posible. Sin embargo, las curvas para el electrodo de 1,5 mm (figura 10) no eran demasiado suaves y parece haber un efecto significativo de la forma del electrodo. Como alternativa, las curvas para los electrodos de 1,0 mm (figura 11) son bastante predecibles y no muestran una gran dependencia de la forma del electrodo. Además, existía un efecto de ajuste a escala donde los voltajes umbral de los electrodos de 1,0 mm eran 10-20 V más bajos que los electrodos de 1,5 mm a frecuencias correspondientes.

Tal como se muestra esquemáticamente en la figura 12, se realizó un ensayo adicional para determinar la estabilidad del transporte de gotitas a lo largo del tiempo. Una gotita se sometió a un ciclo de forma programable a través de cuatro electrodos cuadrados de 1,5 mm al voltaje mínimo requerido para mantener el transporte a una frecuencia de conmutación de 4 Hz o 8 Hz. A intervalos de cinco minutos el voltaje mínimo para el transporte continuo se ensayó y se ajustó. Los ensayos que se realizaron durante una hora o más demuestran una tendencia general de requisito de voltaje en aumento a lo largo del tiempo que se debe, presumiblemente, a la degradación del aislante y la contaminación de la superficie del aislante. Sin embargo, en cada caso se realizaron más de 20.000 ciclos de transporte de gotitas durante el experimento.

En referencia al gráfico mostrado en la figura 13, también se realizaron ensayos para determinar los requisitos mínimos de voltaje para el transporte de gotitas a una frecuencia de conmutación dada. Se usaron chips microfluídicos digitales para tanto una estructura abierta (es decir, co-planar sin una placa superior) como confinada (es decir, bi-planar con una placa superior) en una PCB (véase las figuras 1B y 4B, respectivamente). Los electrodos ($1,5 \times 1,5 \text{ mm}^2$) se modelaron en cobre a un grosor final de ~25 µm. Se perforaron lagunas de tránsito de 150 µm en cada electrodo para proporcionar contactos eléctricos con la parte posterior de la placa. Raíles de toma de tierra se modelaron al lado de todos los electrodos impulsores para proporcionar una conexión a tierra continua a las gotitas, y una máscara de soldadura fotosensible líquida (LPI) (~17 µm) se modeló para que actuara como aislante, dejando expuestos solamente los raíles. Como única etapa posterior al procesamiento, TEFLON® AF se recubrió por

cepillado para hacer a la superficie hidrófoba. Gotitas de un líquido polarizable y conductor (KCl 1 M) se transportaron en los sistemas tanto abierto (co-planar) como confinado (bi-planar). Para el sistema abierto, cada gotita tenía un volumen de 6 μl y una pequeña gota de aceite de silicona (2 μl) se añadió y pareció rodear a la gotita. Para el sistema confinado, el volumen de cada gotita era de 2,5 μl , y todo el chip se llenó con aceite de silicona para facilitar el transporte.

Los voltajes de movimiento mínimos requeridos para transportar con éxito gotitas se midieron para cada sistema a frecuencias de conmutación que variaban entre 1 y 32 Hz. Tal como se muestra gráficamente en la figura 13, los voltajes de funcionamiento para gotitas en los sistemas confinado (bi-planar) y abierto (co-planar) variaban entre 140-260 V y 125-220 V, respectivamente, dependiendo de la frecuencia de conmutación de las gotitas. Esto parece sugerir que el impulsado de las gotitas es facilitado por la ausencia de una placa superior de confinamiento, posiblemente debido al reducido arrastre experimentado por la gota no confinada. La electrolisis de las gotitas, típicamente debida a una cobertura inadecuada del aislamiento, no se observó usando una máscara de soldadura LPI como aislante hasta el voltaje máximo ensayado de 350 V. La carga del aislante, sin embargo, se experimentó más allá de 300 V.

En referencia a las figuras 14A-14D, se muestran vistas superiores de diversas secuencias de imágenes a intervalos de tiempo que demuestran el transporte y mezclado de gotitas. Las figuras 14A-14B representan el transporte y el mezclado de gotitas, respectivamente, para gotitas confinadas por una placa superior (600 μm) (bi-planar). Las figuras 14C-14D representan el transporte y mezclado de gotitas, respectivamente, para gotitas en un sistema abierto (co-planar). El mezclado se realizó a una frecuencia de conmutación de 8 Hz y se completó en 5 segundos para dos gotitas "confinadas" de 2,5 μl , y en 1,8 segundos para dos gotitas de 6 μl en un sistema "abierto". Por lo tanto, las tasas de mezclado (volumen por unidad de tiempo) observadas en el sistema abierto (co-planar) son casi siete veces mayores que en el sistema confinado (bi-planar). Este mezclado mejorado puede atribuirse a la mayor circulación experimentada en la gotita más gruesa, dado que la circulación ha demostrado empeorar anteriormente a medida que las gotitas se hacen más finas.

REFERENCIAS

Las referencias enumeradas a continuación suplementan, explican, proporcionan antecedentes para o enseñan metodología, técnicas y/o procesos.

M.G. Pollack, R.B. Fair, y A.D. Shenderov, "Electrowetting-based actuation of liquid droplets for microfluidic actuation", Appl. Phys. Lett., vol. 77, páginas 1725-1726 (2000).

V. Srinivasan, V.K. Pamula y R.B. Fair, "An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids", Lab Chip, 4(4), 310, (2004)

B. Berge y J. Peseux, "Variable focal lens controlled by an external voltage: An application of electrowetting", The European Physical Journal E, vol. 3, página 159 (2000).

M.W.J. Prins, W.J.J. Welters y J.W. Weekamp, "Fluid control in multichannel structures by electrocapillary pressure", Science, vol. 291, páginas 277-280 (2001).

T. Merkel, L. Pagel y H.W. Glock, "Electric fields in fluidic channels and sensor applications with capacitance", Sensors and Actuators A, vol. 80, páginas 1-7 (2000).

A. Wego, y L. Pagel, "A self-filling micropump based on PCB technology", Sensors and Actuators A, vol. 88, páginas 220-226 (2001).

C. Laritz y L. Pagel, "A microfluidic pH-regulation system based on printed circuit board technology", Sensors and Actuators A, vol. 84, páginas 230-235 (2000).

Li et al., "Development of PDMS-based Microfluidic Device for Cell-based Assays", Chemical Journal of Chinese Universities, vol. 25, no. 1, páginas 4-6 (2004).

A. Wego, S. Richter, L. Pagel, "Fluidic microsystems based on printed circuit board technology", Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 11, no. 5, páginas 528-531 (septiembre de 2001).

A. Wego, H.W. Glock, L. Pagel y S. Richter, "Investigations on thermo-pneumatic volume actuators based on PCB technology", Sensors and Actuators A-Physical, vol. 93, no. 2, páginas 95-102 (30 de septiembre de 2001).

A. Wego y L. Pagel, "A self-filling micropump based on PCB technology", Sensors and Actuators A-Physical, vol. 88, no. 3, páginas 220-226 (5 de marzo 2001).

C. Laritz y L. Pagel, "A microfluidic pH-regulation system based on printed circuit board technology", Sensors and Actuators A-Physical, vol. 84, no. 3, páginas 230-235 (1 de septiembre de 2000).

- T. Merkel, M. Graeber, y L. Pagel, "A new technology for fluidic microsystems based on PCB technology", *Sensors and Actuators A-Physical*, vol. 77, no. 2, páginas 98-105 (12 de octubre de 1999).
- N.T. Nguyen y X.Y. Huang, "Miniature valveless pumps based on printed circuit board technique", *Sensors and Actuators A-Physical*, vol. 88, no. 2, páginas 104-111 (15 de febrero de 2001).
- 5 C.W. Li, C.N. Cheung, J. Yang, C.H. Tzang, y M.S. Yang, "PDMS-based microfluidic device with multi-height structures fabricated by single-step photolithography using printed circuit board as masters", *Analyst*, vol. 128, no. 9, páginas 1137-1142 (2003).
- A. P. Sudarsan y V.M. Ugaz, "Printed circuit technology for fabrication of plastic-based microfluidic devices", *Analytical Chemistry* vol. 76, no. 11, páginas 3229-3235 (1 de junio de 2004).
- 10 G. Jobst, I. Moser, P. Svasek, M. Varahram, Z. Trajanoski, P. Wach, P. Kotanko, F. Skrabal, y G. Urban, "Mass producible miniaturized flow through a device with a biosensor array", *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 43, páginas 121-125 (septiembre de 1997).
- M.A. Unger, H.P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S.R. Quake, "Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography", *Science*, vol. 288, páginas 113-116 (2000).
- 15 A.R. Wheeler, H. Moon, C.A. Bird, R.R. Loo, C.J. Kim, J.A. Loo, R.L. Garrell, "Digital microfluidics with in-line sample purification for proteomics analyses with MALDI-MS", *Analytical Chemistry*, vol. 77, no. 2, páginas 534-40 (2005).
- J.A. Schwartz, J.V. Vykoukal y P.R.C. Gascoyne, "Droplet-based chemistry on a programmable micro-chip", *Lab on a Chip*, vol. 4, no. 1, páginas 11-17 (2004).
- 20 Y. Tan, J.S. Fisher, A.I. Lee, V. Cristini y A. P. Lee, "Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting", *Lab on a Chip*, vol. 4, no. 4, páginas 292-298 (2004).
- J.D. Tice, A.D. Lyon y R.F. Ismagilov, "Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels", *Analytica Chimica Acta*, vol. 507, páginas 73-77 (2004).
- 25 T. Merkel, L. Pagel, H. Glock, "Electric fields in fluidic channels and sensor applications with capacitance", *Sensors and Actuators*, vol. 80, páginas 1-7 (2000).
- G. Medoro, N. Manaresi, A. Leonardi, L. Altomare, M. Tartagni y R. Guerrieri, "A Lab-on-a-Chip for Cell Detection and Manipulation", *IEEE Sensors Journal*, vol. 3, páginas 317-325 (2003).
- L. Altomare, M. Borgatti, G. Medoro, M. Manaresi, M. Tartagni, R. Guerrieri y R. Gambari, "Levitation and Movement of Human Tumor Cells Using a Printed Circuit Board Device Based on Software-Controlled Dielectrophoresis", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 82, páginas 474-479 (2003).
- 30

Se entenderá que diversos detalles de la materia desvelada en el presente documento pueden cambiarse sin alejarse del alcance de la materia desvelada en el presente documento. Además, la descripción anterior es para fines de ilustración solamente y no con fines de limitación.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para manipular gotitas, comprendiendo el aparato:
 - (a) un sustrato de placa de circuito impreso (12) que comprende una primera superficie lateral (13) y una segunda superficie lateral (14);
 - 5 (b) una serie de electrodos (16) dispuestos sobre la primera superficie lateral del sustrato;
 - (c) una capa dieléctrica (22) dispuesta sobre la primera superficie lateral del sustrato y modelada para cubrir los electrodos; y
 - (d) un selector de electrodos para crear de forma dinámica una secuencia de activación de los electrodos de la serie, con lo cual una gotita dispuesta sobre la primera superficie lateral del sustrato es manipulada eléctricamente,
- 10 en el que el sustrato de la placa de circuito impreso (12) comprende una pluralidad de aberturas de sustrato definidas en su interior y que se extienden desde la primera superficie lateral del sustrato (13) a la segunda superficie lateral del sustrato (14) y cada electrodo (16) comprende una abertura de electrodo, en el que cada abertura de electrodo está alineada con una de la pluralidad de aberturas de sustrato para definir una pluralidad de lagunas de tránsito (24, 24', 24'', 24''') a través del aparato.
- 15 2. El aparato de la reivindicación 1, que comprende, además, una serie de uno o más electrodos de referencia (18) ajustable a un potencial de referencia común dispuestos en relación al menos sustancialmente co-planar con la serie de electrodos impulsores (16).
3. El aparato de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la serie de electrodos de referencia (18) comprende una rejilla de estructuras alargadas.
- 20 4. El aparato de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la altura de la rejilla de estructuras alargadas es al menos igual a la altura de la gotita dispuesta sobre la primera superficie lateral del sustrato (13).
5. El aparato de la reivindicación 1, que comprende, además, un electrodo de referencia alargado (18) sustancialmente paralelo a y separado de la primera superficie lateral del sustrato (13) una distancia para definir un espacio (G) entre el electrodo de referencia y la primera superficie lateral del sustrato, en el que la distancia es suficiente para contener a una gotita dispuesta en el espacio.
- 25 6. El aparato de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el electrodo de referencia alargado (18) es una serie de uno o más cables.
7. El aparato de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el electrodo de referencia alargado (18) es una placa.
- 30 8. El aparato de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la placa del electrodo de referencia (18) comprende una superficie de placa (14') enfrentada a la superficie del sustrato (13), y la superficie de placa es hidrófoba.
9. El aparato de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que las lagunas de tránsito (24') se llenan con una sustancia dieléctrica.
10. El aparato de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que las lagunas de tránsito (24'') se llenan con una resina.
- 35 11. El aparato de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la resina es una epoxi conductora o una epoxi ópticamente transparente.
12. El aparato de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el sustrato (12) define al menos un orificio de entrada de gotitas (32) adyacente a al menos uno de los electrodos de la serie de electrodos.
- 40 13. El aparato de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la al menos un orificio de entrada de gotitas (32) está en comunicación con una fuente de flujo líquido seleccionada entre el grupo constituido por un tubo flexible, una jeringa, una pipeta, una bomba fluidica externa, un tubo capilar de vidrio, un tubo intravenoso y una luz de microdiálisis.
14. El aparato de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, en el que el sustrato (12) define al menos un orificio de salida de gotitas (32) adyacente a al menos uno de los electrodos de la serie de electrodos.
- 45 15. El aparato de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el al menos un orificio de salida de gotitas (32) está en comunicación con una fuente de flujo líquido seleccionada entre el grupo constituido por un tubo flexible, una jeringa, una pipeta, una bomba fluidica externa, un tubo capilar de vidrio, un tubo intravenoso y una luz de microdiálisis.

16. El aparato de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la sustancia dieléctrica es un material de máscara de soldadura, material depositado por rotación, material de recubrimiento por inmersión, material de recubrimiento con cepillado o por pulverización, depositable por vapor, o depositado por pulverización catódica.
- 5 17. El aparato de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el material de máscara de soldadura se selecciona entre el grupo constituido por máscara de soldadura fotosensible líquida (LPI) y máscara de soldadura de película seca (DFSS).
- 10 18. El aparato de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende, además, un componente electrónico conectado de forma operativa al sustrato de la placa de circuito impreso, estando el componente electrónico seleccionado entre el grupo constituido por microcontroladores, relés, multiplexores de alto voltaje, convertidores de voltaje, diodos emisores de luz (LED), fotodiodos, tubos foto-multiplicadores (PMT), elementos calefactores, termistores, dispositivos de resistencia a temperatura (RTD) y electrodos para mediciones electroquímicas.

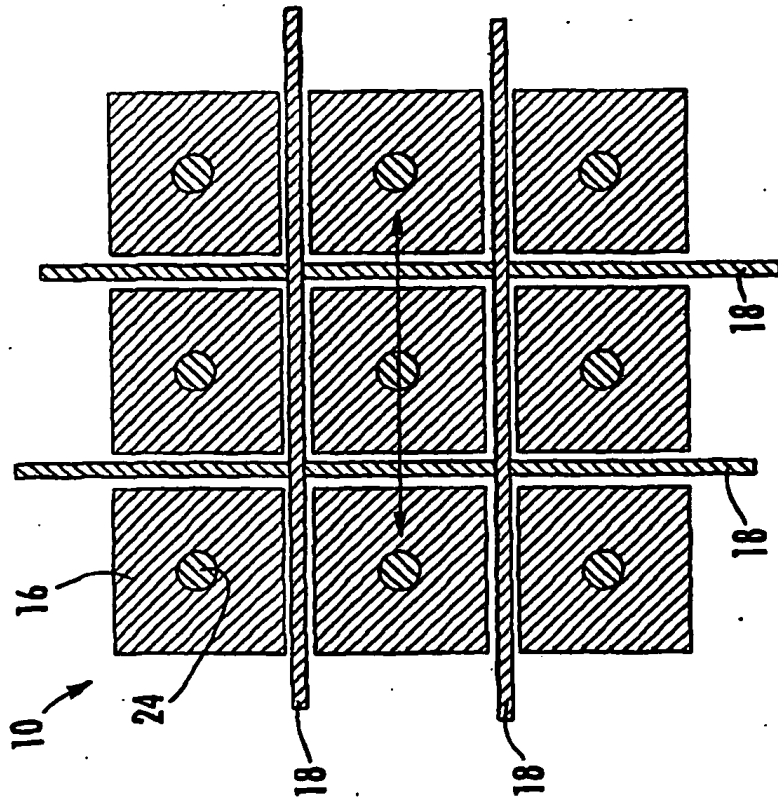


FIG. 1A

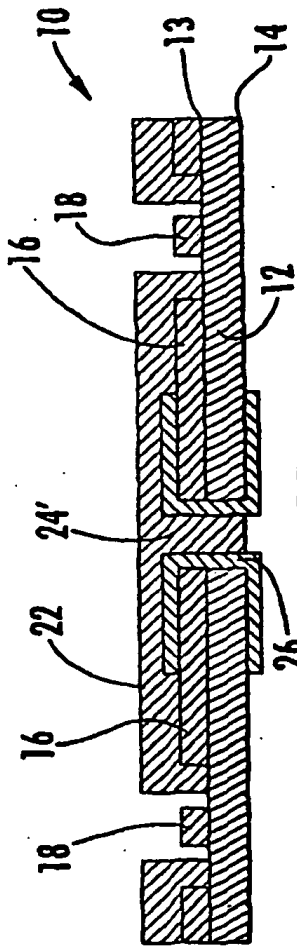


FIG. 1B

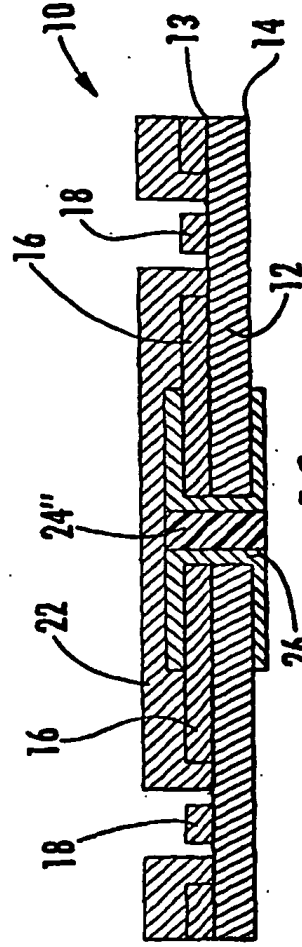


FIG. 1C

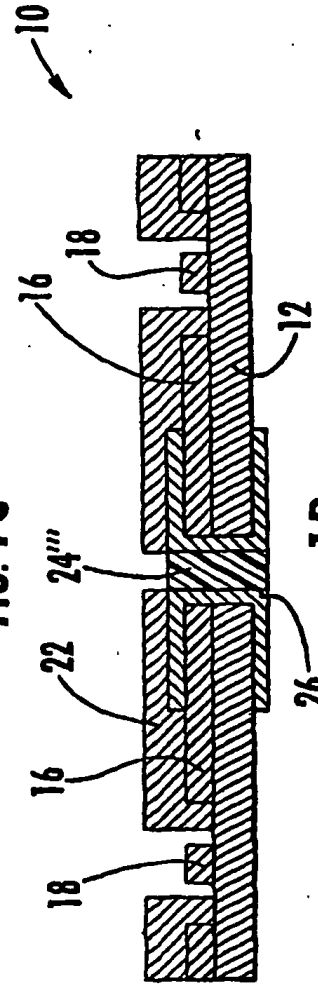
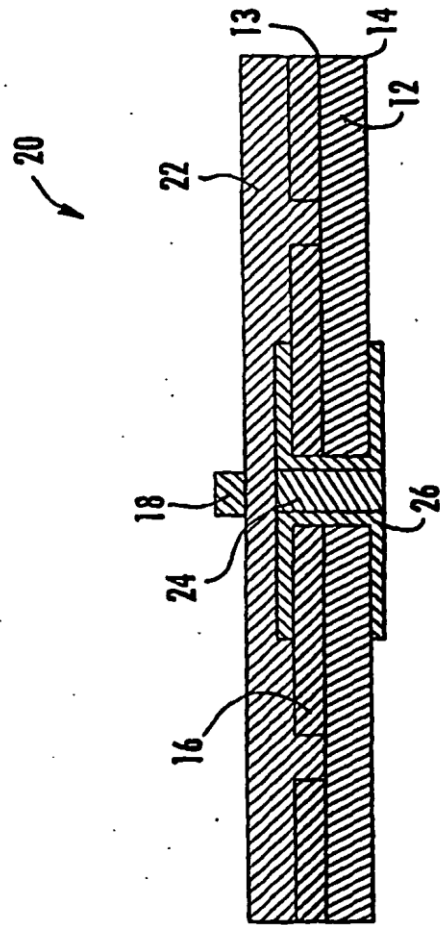
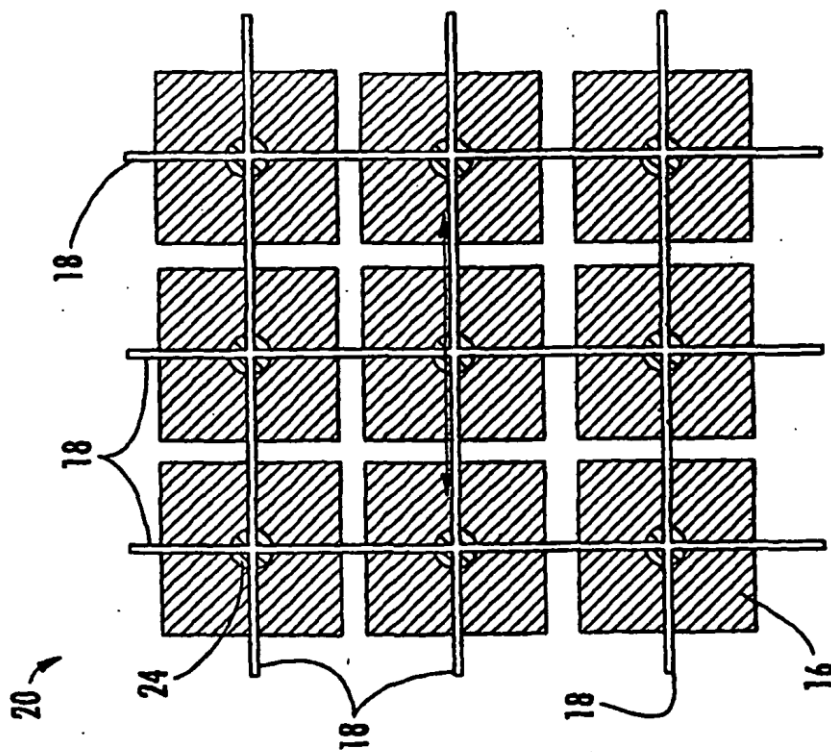


FIG. 1D



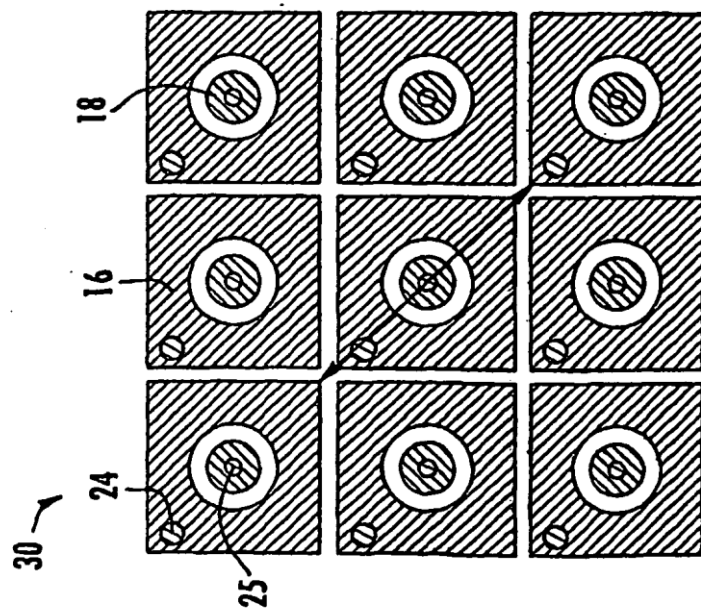


FIG. 3A

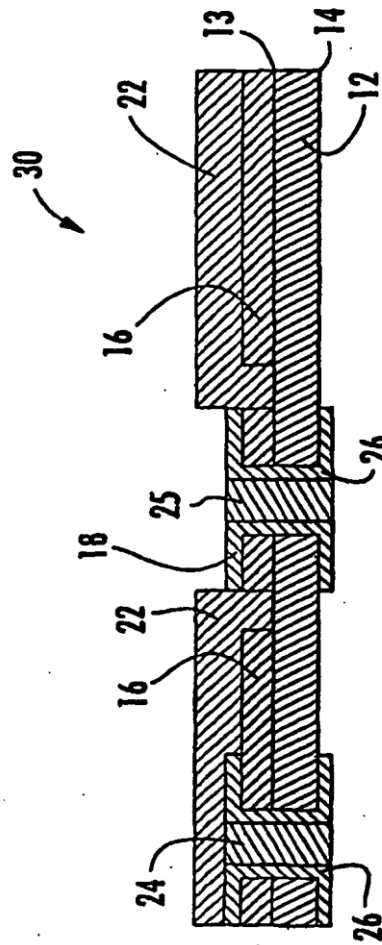


FIG. 3B

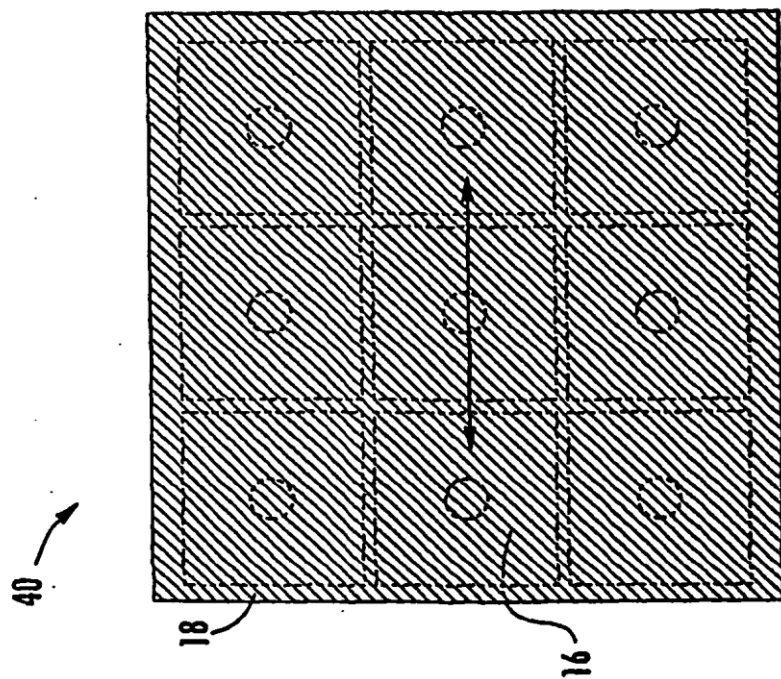


FIG. 4A

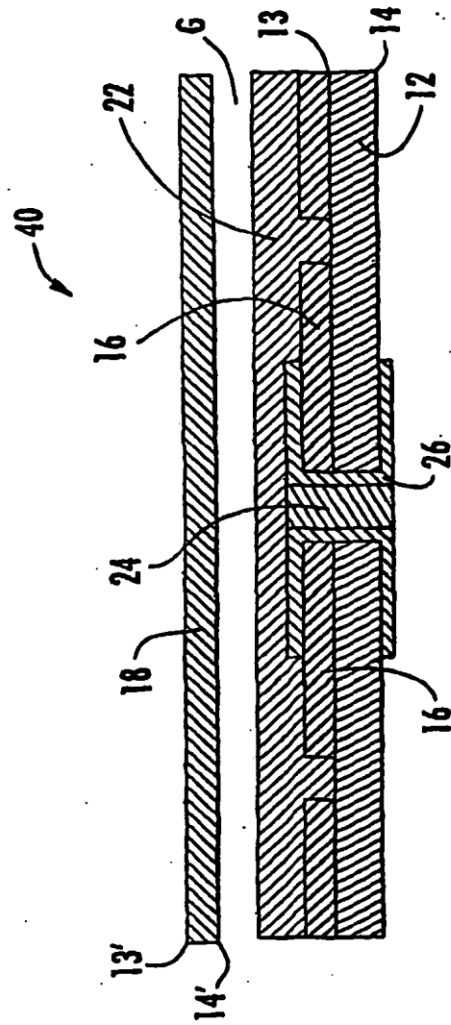


FIG. 4B

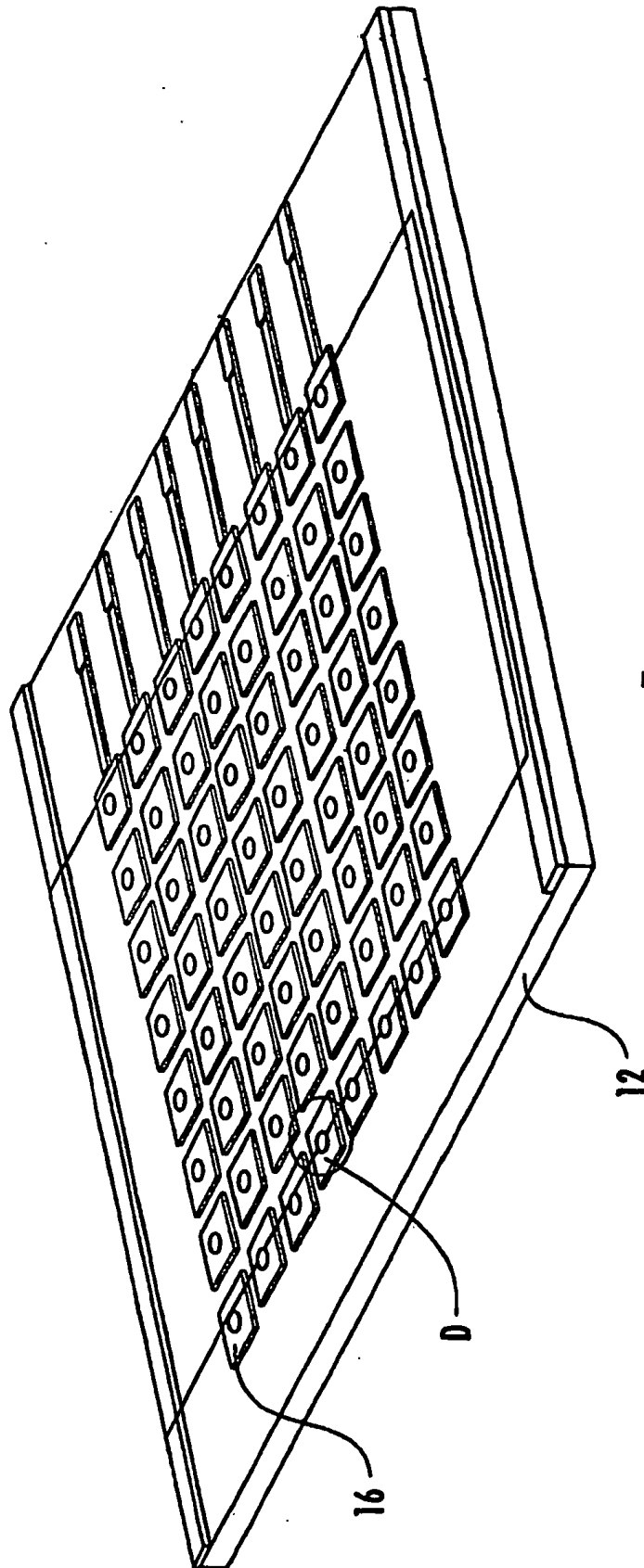


FIG. 5

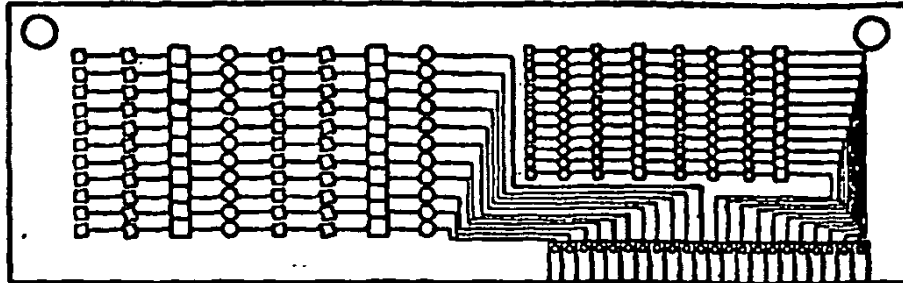


FIG. 6

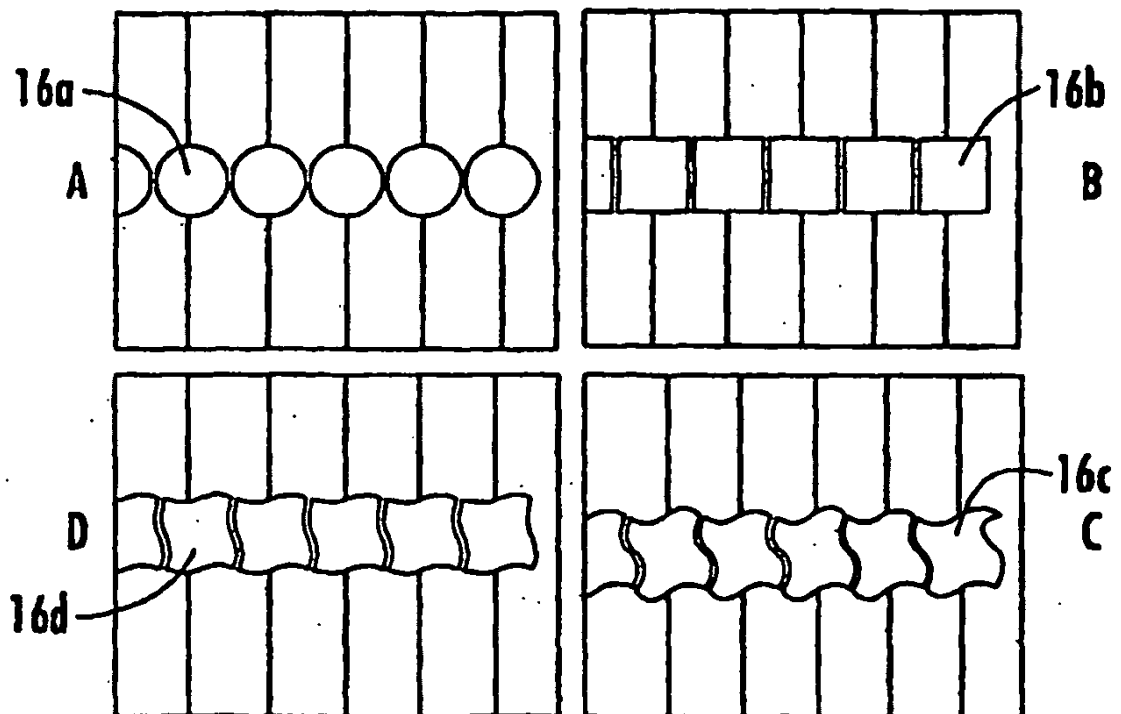


FIG. 7

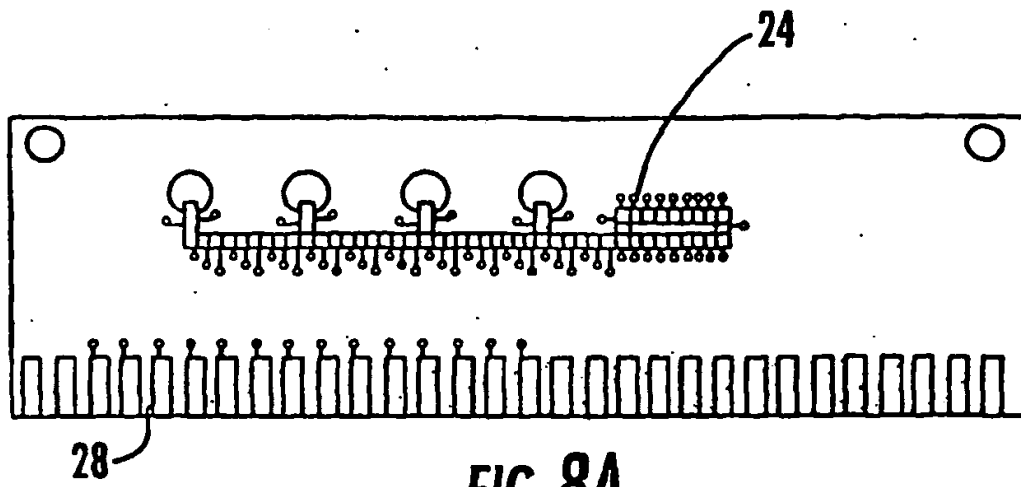


FIG. 8A

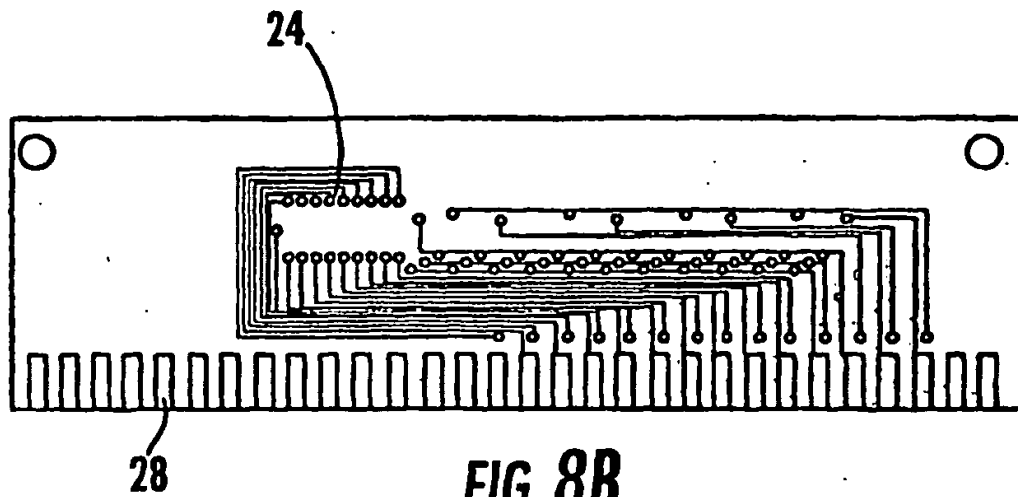
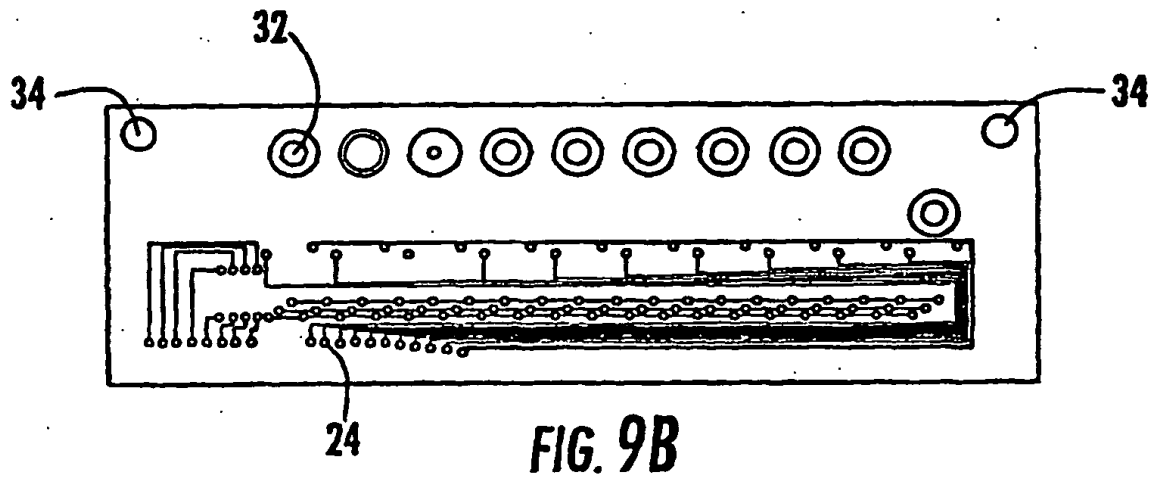
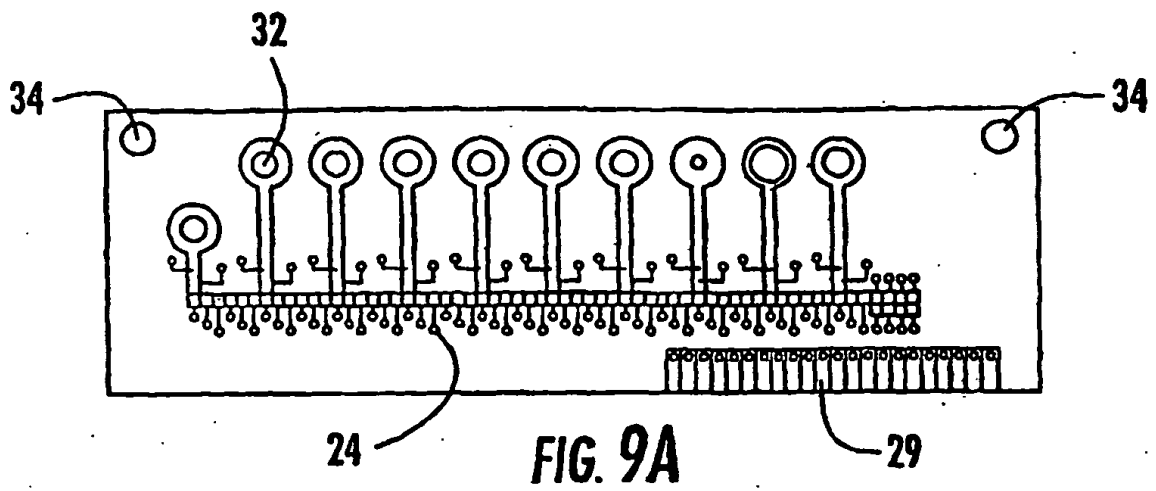


FIG. 8B



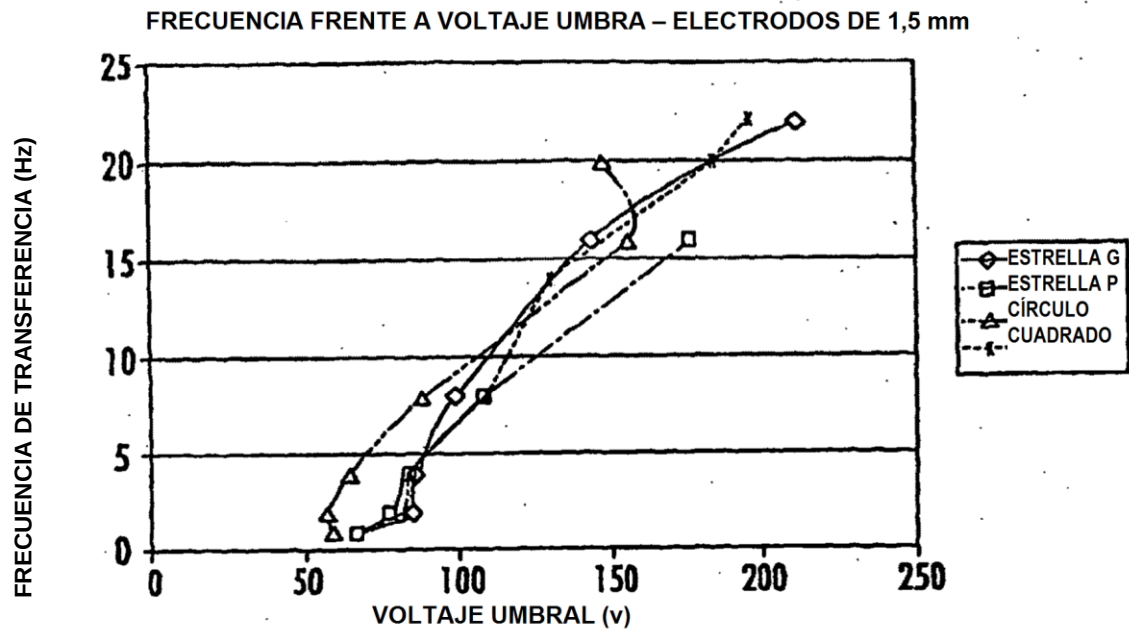


FIG. 10

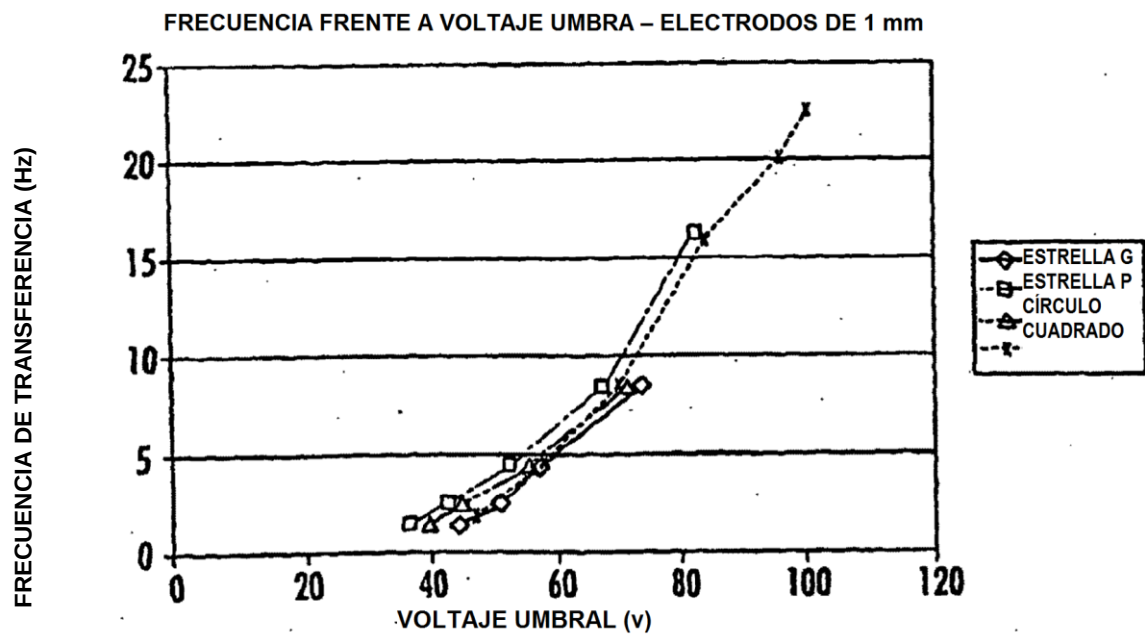


FIG. 11

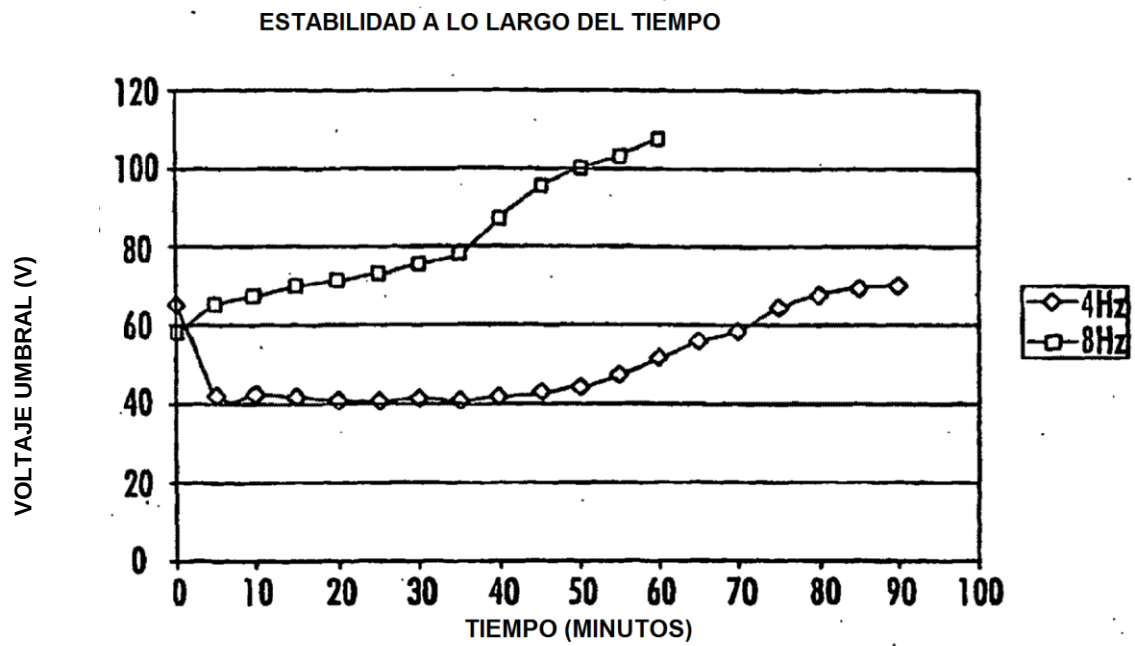


FIG. 12

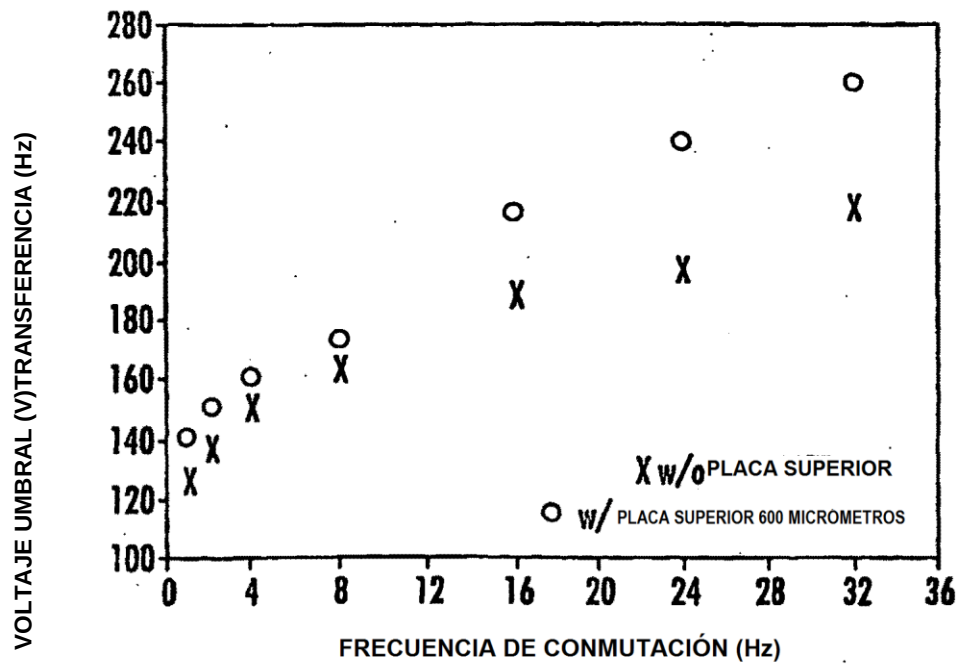


FIG. 13

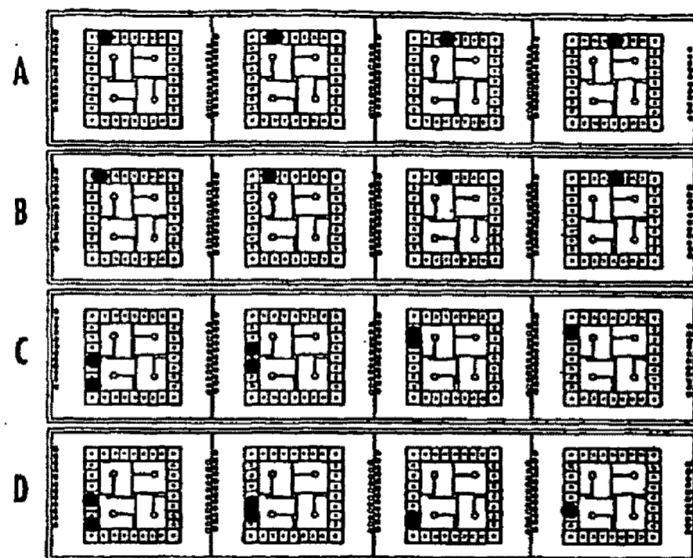


FIG. 14