

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 538**

51 Int. Cl.:

**B41J 2/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2002 PCT/US2002/17656**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2003 WO03022583**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2002 E 02739673 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 1409254**

54 Título: **Eyección acústica de fluidos usando elementos de enfoque de número F grande**

30 Prioridad:

**20.07.2001 US 910690**

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

**29.01.2018**

73 Titular/es:

**LABCYTE INC. (100.0%)  
170 Rose Orchard Way  
San Jose CA 95134, US**

72 Inventor/es:

**STEARNS, RICHARD, G. y  
ELLSON, RICHARD, N.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 651 538 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Eyección acústica de fluidos usando elementos de enfoque de número F grande

Campo técnico

5 Esta invención se relaciona en general con el uso de energía acústica enfocada en la eyección de fluidos, y más particularmente se relaciona con eyección acústica de gotitas de fluido utilizando un elemento de enfoque de número F grande.

Técnica antecedente

10 Una serie de patentes han descrito el uso de energía acústica en la eyección de gotitas. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,308,547 de Lovelady et al. describe un emisor de gotas líquidas que utiliza principios acústicos en la eyección de líquidos de un cuerpo de líquido sobre un documento en movimiento para formar caracteres o códigos de barras sobre el mismo. Lovelady et al está dirigido a aparatos de impresión de chorro de tinta sin boquilla en donde gotas controladas de tinta son impulsadas mediante una fuerza acústica producida por un transductor curvado en o por debajo de la superficie de la tinta.

15 La Patente de Lovelady et al. hace uso de un transductor de cubierta piezoeléctrica para generar y también enfocar la energía acústica. También se han desarrollado varios otros métodos para enfocar la energía acústica generada y eyectar una gotita de líquido. Por ejemplo, lentes de enfoque acústico esféricos iluminados acústicamente como se describe en la Patente de los Estados Unidos. No. 4,751,529 de Elrod et al y transductores piezoeléctricos planos con electrodos interdigitados como se describe en la Patente de los Estados Unidos. No. 4,697,105 de Quate et al. La tecnología de eyector de gotitas existentes ha sido utilizada en el diseño de diversas configuraciones de cabezas de impresión, variando desde realizaciones de eyector individual relativamente simple para escáneres de salida de rastreo (ROS) hasta realizaciones más complejas, tales como arreglos mono o bidimensionales de anchura de página completa de eyectores de gotitas para impresión en línea. También se ha encontrado uso en la síntesis de disposiciones de materiales biológicos, como se describe en la solicitud de la Patente de los Estados Unidos Publicada Cependiente asignada en común Nos.: US 2002/0037579, "Acoustic Ejection of Fluids from a Plurality of Reservoirs", publicada el 28 de Marzo de 2002; U.S. 2002/0061258, "Focused Acoustic Energy in the Preparation and Screening of Combinatorial Libraries", publicada el 23 de Mayo de 2002; y U.S. 2002/0042077, "Arrays of Partially Nonhybridizing Oligonucleotides and Preparation Thereof Using Focused Acoustic Energy", publicada el 11 de Abril de 2002.

20 Sin embargo, el desarrollo de eyección de fluidos sin boquilla ha estado limitado en general a aplicaciones de impresión con tinta y se ha basado exclusivamente en lentes acústicos que tienen números F de aproximadamente 1. Desafortunadamente, los lentes de número F bajo plantean restricciones sobre la geometría del reservorio del nivel de fluido y proveen profundidades foco relativamente limitada, incrementando la sensibilidad del nivel de fluido en el reservorio. Por ejemplo, en aplicaciones de arreglos bimoleculares los diversos materiales bimoleculares a partir de los cuales se construye el arreglo están contenidos usualmente en pozos individuales en una placa de pozos. Estos pozos tienen frecuentemente relaciones de aspecto de aproximadamente 5:1, esto es, los pozos son cinco veces tan profundos como su diámetro. La estrechez de los pozos requiere que cuando se usan los lentes F1 la superficie del fluido dentro del reservorio no sea desde el lente más que la anchura de la apertura del lente. Por lo tanto, cuando se utiliza un lente F1 en un pozo de relación de aspecto 5:1, solamente la quinta parte del fondo del reservorio puede ser llenada con fluido.

30 Así, hay necesidad en la técnica para dispositivos y métodos de eyección de fluidos acústica mejorados que tenga suficiente exactitud en la eyección de gotitas de manera que se permita la preparación de arreglos moleculares de alta densidad sin las desventajas asociadas con los lentes de número F bajo. A la vez que el uso de lentes F2 ha sido sugerido en Elrod et al. (1989), "Nozzleless droplet formation with focused acoustic beams," J. Appl. Phys 65(9):3441-3447, la referencia indica que tales lentes proveen resultados impredecibles en términos de diámetro de gotita y profundidad utilizable del foco. Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que lentes con números F más grandes proveen ventajas adicionales sobre los lentes F1 puesto que el uso de lentes que tienen números F mayores de 2 permiten un control mayor sobre el tamaño de las gotitas y la velocidad, a la vez que provee profundidades de foco notablemente mejoradas.

Divulgación de la invención

50 De acuerdo con lo anterior, es un objeto de la presente invención proveer dispositivos y métodos que superen las desventajas antes mencionadas de la técnica anterior. En un aspecto de la invención, se provee un dispositivo para eyectar acústicamente una gotita de fluido hacia un sitio designado sobre una superficie de sustrato, como se define en la reivindicación 1. El dispositivo puede comprender adicionalmente un medio para posicionar el eyector en relación de acoplamiento acústico al reservorio. Preferiblemente, la relación es mayor que aproximadamente 3:1, o incluso mayor que aproximadamente 4:1. El dispositivo también puede comprender una pluralidad de reservorios adaptado

cada uno para contener un fluido, y en el que el dispositivo es capaz de eyectar una gotita de fluido desde cada uno de la pluralidad de reservorios hacia una pluralidad de sitios designados sobre la superficie de sustrato.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para eyectar un fluido desde un reservorio de fluido hacia sitios designados sobre una superficie de sustrato, como se define en la reivindicación 32.

5 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B ilustran esquemáticamente la eyección de gotitas desde un lente con número F bajo, esto es, que tiene un número F de aproximadamente menos de 1, y uno de número F alto, esto es, que tiene un número F de aproximadamente más de 2, respectivamente.

10 Las Figuras 2A y 2B, citadas colectivamente como Figura 2, ilustran esquemáticamente en una vista en sección transversal simplificada una realización del dispositivo de la invención que comprende primero y segundo reservorios, un eyector acústico y medios para posicionamiento del eyector. La Figura 2A muestra el eyector acústico acoplado acústicamente al primer reservorio y que ha sido activado con el fin de eyectar una gotita de fluido desde dentro del primer reservorio hacia un sitio designado sobre una superficie de sustrato. La Figura 2B muestra el eyector acústico acoplado acústicamente a un segundo reservorio.

15 Las Figuras 3A, 3B y 3C, citadas colectivamente como Figura 3, ilustran en una vista esquemática una variación de la realización de la invención de la Figura 2 en la que los reservorios comprenden pozos individuales en una placa de pozos de reservorio y el sustrato comprende una placa de pozos más pequeña con un número correspondiente de pozos. La Figura 3A es una vista plana superior esquemática de las dos placas de pozos, esto es, la placa de pozos del reservorio y la placa de pozos del sustrato. La Figura 3B ilustra en una vista en sección transversal un dispositivo que comprende la placa de pozo del reservorio de la Figura 3A acoplada acústicamente con un eyector acústico, en la que una gotita es eyectada desde un primer pozo de la placa de pozos del reservorio hacia un primer pozo de la placa de pozos del sustrato. La Figura 3C ilustra en una vista en sección transversal el dispositivo ilustrado en la Figura 3B, en el que el eyector acústico está acoplado acústicamente al segundo pozo de la placa de pozos del reservorio y adicionalmente en el que el dispositivo está alineado para permitir que el eyector acústico eyecte una gotita desde el segundo pozo de la placa de pozos del reservorio a un segundo pozo de la placa de pozos del sustrato.

La Figura 4 ilustra gráficamente los cambios en el volumen de gotita con respecto a la duración de la ráfaga de tono para un lente F3 que utiliza potencia acústica de 0.8 dB por encima del umbral de eyección y que tiene una frecuencia acústica de 26 MHz.

30 La Figura 5 ilustra gráficamente los cambios en la velocidad de la gotita con respecto a la duración de la ráfaga de tono para un lente F3 que utiliza una potencia acústica de 0.8 dB por encima del umbral de eyección y que tiene una frecuencia acústica de 30 MHz.

La Figura 6 ilustra gráficamente cambios en el volumen de eyección total con respecto a la duración de la ráfaga de tono para un lente F3 que utiliza potencia acústica de 1.6 dB por encima del umbral de eyección y que tiene una frecuencia acústica de 26 MHz.

35 La Figura 7 ilustra gráficamente cambios en el volumen de eyección total con respecto a la frecuencia acústica para un lente F3 que utiliza una potencia acústica de 0.8 y 1.6 dB por encima del umbral de eyección y que tiene una duración de ráfaga de tono de 65  $\mu$ seg.

40 La Figura 8 ilustra gráficamente cambios en el volumen de gotita con respecto a la potencia acústica por encima del umbral de eyección para un lente F3 que utiliza ráfagas de tono de 45, 65 y 105  $\mu$ seg a una frecuencia acústica de 30 MHz.

La Figura 9 ilustra gráficamente cambios en el diámetro de la gotita con respecto a la frecuencia acústica a diversos niveles de potencia de entrada utilizando frecuencias acústicas de 26, 30 y 34 MHz.

La Figura 10 ilustra gráficamente cambios en la velocidad de gotita con respecto a la frecuencia acústica a diversos niveles de potencia de entrada utilizando frecuencias acústicas de 26, 30 y 34 MHz.

45 Modos para llevar a cabo la invención

Definiciones y visión previa:

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no está limitada a fluidos, biomoléculas o estructuras de dispositivos específicos, puesto que los tales pueden variar. También debe entenderse

que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares.

Debe anotarse que, tal como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, una referencia a "un reservorio" incluye una pluralidad de reservorios, referencia a "un fluido" incluye una pluralidad de fluidos, referencia a "una biomolécula" incluye una combinación de biomoléculas y similares.

En la descripción y reivindicación de la presente invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones fijadas a continuación.

Los términos "acoplamiento acústico" y "acoplado acústicamente" utilizados aquí se refieren a un estado en el que un objeto es colocado en contacto directo o indirecto con otro objeto de tal manera que permita que una radiación acústica sea transferida entre los objetos sin pérdida sustancial de energía acústica. Cuando dos artículos están acoplados acústicamente de manera indirecta, se requiere de un "medio de acoplamiento acústico" para proveer un intermediario a través del cual pueda ser transmitida la radiación acústica. Así, un eyector puede ser acoplado acústicamente a un fluido, por ejemplo, sumergiendo el eyector en el fluido o interponiendo un medio de acoplamiento acústico entre el eyector y el fluido para transferir la radiación acústica generada por el eyector a través del medio de acoplamiento acústico y hacia el fluido.

El término "absorber" tal como se utiliza aquí se refiere a la retención no covalente de una molécula por una superficie de sustrato. Esto es, la adsorción ocurre como resultado de la interacción no covalente entre una superficie del sustrato y unidades estructurales adsorbentes presentes sobre la molécula que es adsorbida. La adsorción puede ocurrir a través de puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, atracción polar o fuerzas electrostáticas (esto es, a través de enlaces iónicos). Ejemplos de unidades estructurales adsorbentes incluyen, pero no se limitan a, grupos amina, unidades estructurales de ácido carboxílico, grupos hidroxilo, grupos nitroso, sulfonas y similares.

El término "arreglo" utilizado aquí se refiere a un arreglo bidimensional de características tales como un arreglo de reservorios (por ejemplo, pozos en una placa de pozos) o una disposición de gotitas de fluido o unidades estructurales moleculares sobre una superficie de sustrato (tal como en un arreglo de oligonucleótidos o peptídico). Los arreglos están compuestos generalmente de componentes regulares, ordenados, como por ejemplo, en una rejilla rectilínea, bandas paralelas, espirales y similares, pero pueden utilizarse ventajosamente arreglos no ordenados también. Un arreglo difiere de un patrón en que los patrones no necesariamente contienen características regulares y ordenadas. Ni los arreglos ni los patrones formados utilizando los dispositivos y métodos de la invención tienen significado óptico al ojo humano a simple vista. Por ejemplo, la invención no involucra impresión con tinta sobre papel u otros sustratos con el fin de formar letras, números, códigos de barras, figuras u otras inscripciones que tengan significado óptico al ojo humano a simple vista. Además, los arreglos y patrones formados por la deposición de gotitas eyectadas en una superficie tal como se proveen aquí son de preferencia sustancialmente invisibles al ojo humano a simple vista. Los arreglos típica pero no necesariamente comprenden al menos aproximadamente 4 hasta aproximadamente 10.000.000 de componentes, generalmente en el rango de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 1.000.000 de componentes.

El término "unido", como en, por ejemplo, una superficie de sustrato que tiene una unidad estructural molecular "unida" al mismo (por ejemplo en las unidades estructurales individuales en arreglos generados utilizando la metodología de la invención) incluye enlace covalente, adsorción e inmovilización física. Los términos "enlace" y "enlazado" son idénticos en significado al término "unido".

El término "biomoléculas" tal como se utiliza aquí se refiere a cualquier molécula orgánica, bien sea de origen natural, producida por recombinación o sintetizada químicamente en todo o en parte, que es, fue o puede ser parte de un organismo vivo. El término abarca, por ejemplo, nucleótidos, aminoácidos, monosacáridos, así como especies oligoméricas y poliméricas tales como oligonucleótidos y polinucleótidos, moléculas peptídicas tales como oligopéptidos, polipéptidos y proteínas, y sacáridos tales como disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y similares.

Será evidente que, tal como se utilizan aquí los términos "nucleósido" y "nucleótido" se refieren a nucleósidos y nucleótidos que contienen no solamente las bases de purina y pirimidina convencionales, esto es, adenina (A), timina (T), citosina (C), guanina (G) y uracilo (U), sino también formas protegidas de las mismas, por ejemplo, en las que la base está protegida con un grupo protector tal como acetilo, difluoroacetilo, trifluoroacetilo, isobutirilo o benzoilo, y análogos de purina y pirimidina. Análogos adecuados serán conocidos para los experimentados en la técnica y están descritos en los textos y literatura pertinentes. Análogos comunes incluyen, pero no se limitan a, 1-metiladenina, 2-metiladenina, N<sup>6</sup>-metiladenina, N<sup>6</sup>-isopentil-adenina, 2-metilthio-N<sup>6</sup>-isopentiladenina, N,N-dimetiladenina, 8-bromo-adenina, 2-tiocitosina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, 5-etilcitosina, 4-acetilcitosina, 1-metilguanina, 2-metilguanina, 7-metilguanina, 2,2-dimetilguanina, 8-bromo-guanina, 8-chloroguanina, 8-aminoguanina, 8-metilguanina, 8-tioguanina, 5-fluoro-uracilo, 5-bromouracilo, 5-chlorouracilo, 5-iodouracilo, 5-etiluracilo, 5-propluracilo, 5-metoxiuracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-(metil-aminometil)uracilo, 5-(carboximetilaminometil)uracilo, 2-thiouracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-(2-bromovinilo)uracilo, uracilo-5-oxiaceticácido,

ácido uracil-5-oxiacético metil éster, pseudouracilo, 1-metilpseudouracilo, queosina, inosina, 1-metilinosina, hipoxantina, xantina, 2-aminopurina, 6-hidroxiaminopurina, 6-tiopurina y 2,6-diaminopurina.

Además, los términos "nucleósido" y "nucleótido" incluyen aquellas unidades estructurales que contienen no solamente azúcares de ribosa y desoxirribosa convencionales, sino también otros azúcares. Nucleósidos o nucleótidos modificados incluyen también modificaciones sobre la unidad estructural de azúcar, por ejemplo, en los que uno o más de los grupos hidroxilo son reemplazados con átomos de halógeno o grupos alifáticos, o están funcionalizados como éteres, aminas o similares.

Tal como se utiliza aquí, el término "oligonucleótidos" será genérico para polidesoxinucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), a polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), a cualquier otro tipo de polinucleótido que es un N-glicósido de una base de purina o pirimidina, y a otros polímeros que contienen estructuras no nucleotídicas, con la condición de que los polímeros contengan núcleos bases en una configuración que permita el apareamiento de bases y el apilamiento de bases, tal como se encuentra en ADN y ARN. Así, estos términos incluyen tipos conocidos de modificaciones de oligonucleótidos, por ejemplo, sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), con enlaces negativamente cargados (por ejemplo, fosfortioatos, fosforditioatos, etc.), y con enlaces cargados positivamente (por ejemplo, aminoalquilfosforamidatos, aminoalquilfosfotriésteres), aquellos que contienen unidades estructurales pendientes, tales como, por ejemplo, proteínas (incluyendo nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señalización, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.). Aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etcétera). No hay una distinción prevista en longitud entre los términos "Polinucleótidos" y "oligonucleótidos", y estos términos serán utilizados de forma intercambiable. Estos términos se refieren solamente a la estructura primaria de la molécula. Tal como se utilizan aquí los símbolos para nucleótidos y polinucleótidos están de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature recommendations (Biochemistry 9:4022, 1970).

Moléculas "peptídicas" se refieren a péptidos, fragmentos de péptidos, y proteínas, esto es, oligómeros o polímeros en los que los monómeros constituyentes son alfa aminoácidos enlazados a través de enlaces amida. Los aminoácidos de las moléculas peptídicas presentes incluyen los veinte aminoácidos convencionales, estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como, aminoácidos disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen, pero no se limitan a, - alanina, naftilalanina, 3 piridilalanina, 4-hidroxiprolina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3- metilhistidina, 5-hidroxilisina y nor-leucina.

El término "fluido" tal como se utiliza aquí se refiere a materia que es no sólida o al menos parcialmente gaseosa y/o líquida. Un fluido puede contener un sólido que está mínima, parcial o completamente solvatado, dispersado o suspendido. Ejemplos de fluidos incluyen, sin limitación, líquidos acuosos (incluyendo agua *per se* y agua salada) y líquidos no acuosos tales como solventes orgánicos y similares. Tal como se utiliza aquí, el término "fluido" no es sinónimo con el término "tinta" en cuanto una tinta debe contener un colorante y puede no ser gaseosa y/o líquida.

El término "reservorio" tal como se utiliza aquí se refiere a un receptáculo o cámara para mantener o contener un fluido. Así, un fluido en un reservorio necesariamente tiene una superficie libre, esto es, una superficie que permite que una gotita sea eyectada desde el mismo.

El término "sustrato" tal como se utiliza aquí se refiere a cualquier material que tiene una superficie sobre la cual pueden depositarse uno o más fluidos. El sustrato puede ser construido en cualquiera de un cierto número de formas tales como obleas, láminas, placas de pozo, membranas, por ejemplo. Además, el sustrato puede ser poroso o no poroso según se requiera para cualquier deposición de fluido en particular. Materiales de sustrato adecuado se incluyen, pero no se limitan a, soportes que se utilizan típicamente para síntesis química en fase sólida, por ejemplo, materiales poliméricos (por ejemplo, poliestireno, acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo, polivinil pirrolidona, poliacrilonitrilo, poliacrilamida, metacrilato de polimetilo, politetrafluoretileno, polietileno, polipropileno, fluoruro de polivinilideno, policarbonato, polímeros basados en divinilbenceno estireno), agarosa (por ejemplo, Sepharose®), dextrano (por ejemplo, Sephadex®), polímeros de celulosa y otros polisacáridos, materiales de sílice y basadas en sílice, vidrio (particularmente vidrio de poro controlado, o "CPG") y vidrios, cerámicas funcionalizados y sustratos tales tratados con recubrimientos de superficie, por ejemplo, con polímeros microporosos (particularmente polímeros celulósicos tales como nitrocelulosa), compuestos metálicos (particularmente aluminio microporoso), o similares. A la vez que los materiales de soporte anteriores son representativos de sustratos usados de forma convencional, debe entenderse que el sustrato puede en efecto comprender cualquier material biológico, no biológico, orgánico y/o inorgánico, y puede estar en cualquiera de una gran variedad de formas físicas, por ejemplo, partículas, tiras, precipitados, geles, láminas, tubos, esferas, contenedores, capilares, almohadillas, secciones, películas, placas, láminas, y similares, y puede tener adicionalmente cualquier forma deseada, tal como un disco, cuadrado, esfera, círculo, etcétera. La superficie de sustrato puede o puede no ser plana, por ejemplo, la superficie puede contener regiones elevadas o deprimidas.

El término "modificación de superficie" tal como se utiliza aquí se refiere a la alteración química y/o física de una superficie mediante un proceso aditivo o sustractivo para cambiar una o más propiedades químicas y/o físicas de una superficie de sustrato o un sitio o región seleccionado de una superficie de sustrato. Por ejemplo, la modificación de superficie puede involucrar (1) cambiar las propiedades de humectación de una superficie, (2) funcionalizar una superficie, esto es, proveer, modificar o sustituir grupos funcionales de la superficie, (3) desfuncionalización de una superficie, esto es, eliminar grupos funcionales de la superficie, (4) alterar de alguna otra manera la composición química de una superficie, por ejemplo, a través de grabado, (5) incrementar o disminuir la rugosidad de la superficie, (6) proveer un recubrimiento sobre una superficie, por ejemplo, un recubrimiento que exhiba propiedades de humectación que sean diferentes de las propiedades de humectación de la superficie, y/o (7) depositar partículas sobre una superficie.

La reivindicación 1 es pertinente a un dispositivo para eyectar acústicamente una gotita a través de un sitio designado sobre una superficie de sustrato. El dispositivo puede comprender medios para posicionar el eyector en relación de acoplamiento acústico con cada uno de los reservorios, si hay más de un reservorio presente.

Se sabe que la eyección de gotitas desde la superficie libre de un fluido ocurre cuando se enfoca energía acústica de intensidad suficiente a través del medio fluido sobre la superficie del fluido. La relación de la distancia desde el medio de fluido al punto focal del medio de fluido con respecto al tamaño de la apertura a través de la cual pasa la energía acústica hacia el medio fluido es el número F. Los lentes que tienen un número F menor de 1 generan haces acústicos enfocados con precisión y la distancia focal de tal lente es más corta que la anchura de la apertura del lente. El comportamiento de la eyección de gotas a partir de lentes con números F muy cercanos a 1 es bien conocida en la técnica. En particular, las relaciones entre el tamaño del haz enfocado y el tamaño de gota resultante son bien entendidos, así como las relaciones que gobiernan la sensibilidad de la eyección a la altura del fluido (esto es, a la colocación relativa de la superficie de fluido con respecto al plano focal del haz acústico). También se entienden relativamente bien los factores que gobiernan la aparición de eyección de gotitas secundaria indeseada (conocida como gotas satélite).

Estas relaciones en muchos casos limitan el rendimiento de la eyección de gotas, o limitan la flexibilidad para construir un sistema físico para eyectar gotas de un tamaño diferente, etc., o colocar restricciones fuertes sobre la tolerancia de un sistema de eyección a la variación de ciertos parámetros críticos, tales como la localización de la superficie de fluido con respecto al plano focal del haz acústico. Además, al utilizar una onda acústica de enfoque apretadamente limita de forma natural la capacidad de eyectar gotas desde la parte superior de una capa de fluido de altura h, cuando el haz acústico debe pasar a través de una apertura de anchura sustancialmente menor que h, en el fondo de la capa de fluido. Tal configuración es de interés para muchas aplicaciones, particularmente cuando los reservorios para contener el fluido que va a ser eyectado tiene la forma de placas de pozo convencionalmente utilizadas y comercialmente disponibles. Placas de pozo 1536 típicas de Greiner tienen relaciones de altura a abertura de 3.3 (5H/1.53A mm). Las placas de Greiner y NUNC en formato 384 varían de 3 a 4 (5.5H/1.84A mm y 11.6H/2.9A mm).

El uso de lentes débilmente focalizables, esto es, un lente que tiene un número F mayor que aproximadamente 2, extiende la capacidad de eyección para eyectar gotas a través de una capa de fluido a través de la apertura en el fondo del reservorio que contiene el fluido. Sorprendentemente, también se ha encontrado que el proceso de eyección utilizando un lente de número F grande es significativamente diferente de los procesos observados utilizando lentes con número F más bajo. Estas diferencias, las cuales son bastante novedosas e inesperadas, extienden la flexibilidad y utilidad del uso de ondas acústicas enfocadas en la eyección de gotitas y la manipulación desde una superficie de fluido. Lentes con F # inferiores, esto es, F1, pueden ser utilizados en tanto la apertura del reservorio tenga un diámetro que sea suficiente para dar como resultado que la relación de la distancia efectiva desde la apertura a la sección transversal de la apertura sea mayor que aproximadamente 2:1. El uso de tales lentes es indeseable puesto que tales lentes dan como resultado una variación en la cantidad de energía acústica como función de la profundidad del fluido, incrementando por lo tanto la sensibilidad de la energía de umbral de eyección aparente a la altura de fluido. Tales métodos también son no preferidos como, en aplicaciones en el que el reservorio es un pozo en una placa de pozos, la energía acústica que es absorbida en pozo variará en virtud de la apertura estrecha lo que puede, después de una refracción significativa, pasar indeseable e imprevisiblemente hacia el reservorio e interferir con la eyección de gotitas.

Esquemáticamente, un lente acústico y un haz enfocado típicos se ven como se muestra en la Figura 1. La Figura 1A ilustra el perfil general de la superficie del fluido en el momento de la separación de la gota, para excitación utilizando un lente 2 acústico de número F bajo. En la figura 1A, el haz 4 acústico enfocado es enfocado en la superficie del fluido 6. Como lo discute Elrod et al. (1989) J. Appl. Phys. 65(9):3441-3447, el tamaño del haz enfocado para una explosión acústica de 3 dB es del orden de  $1.02 * F * \lambda$ , donde  $\lambda$  es la longitud de onda acústica. Así, para un lente de número F1 (F1), una explosión acústica de 3 dB tiene un tamaño de haz enfocado casi igual a la longitud de onda acústica. Es bien sabido que para el lente F1, la gota 8 resultante es aproximadamente igual en tamaño al haz enfocado. Este resultado tiene sentido físico, puesto que el haz enfocado revela que ese haz enfocado puede considerarse como generador de una columna, o chorro de fluido que se eleva de la superficie libre debido a la presión de radiación de la onda acústica que actúa sobre la superficie. Puesto que la columna de fluido es apenas del tamaño del haz enfocado en alcance lateral, la bien conocida inestabilidad de chorros de fluido de Rayleigh lleva la expectativa

de que tal columna produciría una gotita de un tamaño comparable al del chorro, y por lo tanto al del haz acústico enfocado.

5 Como se indica en la Figura 1B, los resultados cuando se utiliza un lente 10 de número F más alto difieren sustancialmente de lo que podría esperarse cuando se alcanza el entendimiento general de que la eyección de gotita de F1 como se discutía más arriba. En este caso, la apertura más grande produce en efecto un haz acústico enfocado que tiene una dimensión lateral más grande. Sin embargo, la gota primaria que es eyectada es considerablemente menor en tamaño que el haz enfocado que la produce. Como un ejemplo, cuando se utiliza un lente F3 a una frecuencia acústica de 30 MHz, se esperaría que una gotita primaria tuviera un diámetro comparable con la dimensión lateral del haz acústico enfocado. A 30 MHz, la longitud de onda acústica del agua es 50  $\mu\text{m}$ , dando como resultado un haz acústico enfocado que tiene un diámetro de 153  $\mu\text{m}$ . Inesperadamente, el diámetro real de una gotita producida bajo estas condiciones es de 54  $\mu\text{m}$ , correspondiente relativamente a la frecuencia acústica y no al diámetro del haz acústico enfocado. Se han obtenido resultados similares para lentes F4 también.

15 El hecho de que tales gotas relativamente pequeñas puedan ser producidas con una lente de número F más alto tiene un gran valor práctico, puesto que, para el mismo tamaño de apertura, se puede eyectar desde una capa de fluido de mayor altura (como se indica en la Figura 1B). Utilizando un lente de enfoque débilmente permite que se proyecte el punto focal más allá en una columna de fluido donde bien la apertura o el plano de entrada para la energía acústica está limitado en tamaño. Por ejemplo, considérese la base de un pozo Greiner 1536 cuyo alcance es 1.53 mm. La estrechez del pozo limita la dimensión física del haz acústico que entra a la columna de líquido contenida dentro del pozo puesto que los haces acústicos que son más anchos que la base del pozo da como resultado la generación indeseada de un patrón complejo de refracción en las paredes del pozo. La altura de las paredes en tal pozo es 5 mm, más de 3 veces la dimensión de la base. Utilizando un lente F1 y manteniendo el alcance de la energía acústica dentro de la base del pozo, la profundidad de la cual el lente podría efectuar la eyección estaría sustancialmente por debajo de 2 mm. Por lo tanto, el fluido no podría ser eyectado desde el pozo si el pozo estuviese lleno más de la mitad. En contraste, utilizando un lente de enfoque débil tal como un lente F3, la altura total del líquido estaría dentro del rango del foco.

25 Adicionalmente, la capacidad para eyectar gotas comparables a la longitud de onda acústica utilizando un lente de número F más alto permite una latitud más amplia en la fijación de la localización de la superficie del fluido, con respecto al plano focal del haz acústico. Esto se debe a que la profundidad del foco del haz varía en función del cuadrado del número F. Así, usando un lente de número F más grande, el haz está sustancialmente más cerca del foco para una distancia más larga a lo largo de su dirección de propagación y hay un rango más grande a lo largo del eje de propagación en el cual la superficie del fluido es relativa al plano focal del haz acústico dando como resultado la formación de una gotita. Utilizando un lente F3 a 30 MHz, se ha observado que se eyectará una gota primaria sobre un rango de 1mm de profundidad de fluido, dentro de una ventana de 1 dB de potencia acústica incidente. Este es un rango sustancialmente más grande que el esperado utilizando un lente F1 para producir una gota comparable. Tal mejora en la latitud de la altura de fluido, a la vez que mantiene el tamaño de la gotita, es de gran significado práctico puesto que muchas aplicaciones de dispensación se benefician de tener un volumen de gota altamente repetible.

30 A la vez que no se desea limitarse por la teoría, el resultado inesperado de que las gotitas que tengan un diámetro mucho más pequeño que el tamaño del haz acústico enfocado puedan ser producidas utilizando un número de lente F más grande se debe presumiblemente a detalles sutiles de la inestabilidad de Rayleigh que es responsable de su formación. Puede haber algún papel jugado por la generación de armónicos no lineales en la región focal del haz acústico. El comportamiento novedoso del proceso de formación de gotitas utilizando lentes de número F más alto da como resultado otras características útiles también. Una de estas es la capacidad de sintonizar el volumen de fluido eyectado por ráfaga de tono, tamaño de gotita y/o velocidad de gotita para un lente transductor acústico dados, variando la frecuencia acústica, la duración de la ráfaga de tono y/o la potencia acústica aplicada. La variación de estos parámetros, bien sea separadamente, o en combinación, permite una eyección de fluido controlada con precisión. A continuación se presenta una breve discusión de cada uno de estos parámetros.

Variación de la potencia acústica:

40 En aplicaciones tradicionales de lentes F1, la alteración de la potencia acústica ha servido como un medio para variar la velocidad de eyección. Un nivel de potencia excesivamente alto da como resultado la eyección de gotitas secundarias o "satélite". Inesperadamente, las gotas secundarias o satélite que se forman utilizando lentes de número F más alto tienen propiedades que difieren de las formadas utilizando un lente de número F más bajo. Por ejemplo, la gota secundaria formada utilizando un lente F1 con agua es típicamente mucho más pequeña que la gota primaria. En el caso de un lente F3, la gota secundaria puede ser mucho más grande que la gota primaria. Adicionalmente, el tamaño de la gotita satélite cambia dramáticamente con la duración de la excitación de ráfaga de tono RF y/o la frecuencia acústica y bajo algunas condiciones, la gotita secundaria puede ser mucho más pequeña que la gotita primaria. Este comportamiento inusual puede ser explotado para controlar ampliamente el rango de volúmenes eyectado utilizando un evento de eyección acústico individual. Por ejemplo, si tanto las gotas primarias como las secundarias son eyectadas y depositadas juntas, se ha observado que el volumen total de ambas gotas varía en un rango de aproximadamente 40 pL hasta aproximadamente 700 pL, esto es, más de 1750%.

Se ha observado que para un lente F3 de 25 MHz, a lo largo de un rango de alturas de fluido, la eyección de gota secundaria (satélite) no ocurre hasta que la potencia acústica de entrada es muchos dB por encima del umbral de energía para la eyección de la gota primaria. Específicamente, se ha encontrado que la aplicación de potencia acústica a 0.8 dB por encima del umbral de eyección corresponde a una potencia acústica donde solamente se inyecta la gota primaria, y 1.6 dB por encima del umbral corresponde a una potencia en la que las gotas primaria y satélite son eyectadas. Estos parámetros variarán según las condiciones específicas utilizadas. El rango grande estable en el que solamente una gotita individual es eyectada es de gran beneficio práctico puesto que, en general, se desea que solamente se eyecte la gota primaria, y la presencia de una gota secundaria (satélite) se considera altamente indeseable. Las Figuras 7, 8 y 9 ilustran gráficamente los efectos de variación de la potencia acústica.

10 Variación de la frecuencia acústica:

Como se discutió anteriormente, la variación de la frecuencia acústica permite la variación significativa en el rango de volumen de fluido eyectado cuando la potencia acústica aplicada es suficiente para eyectar gotas tanto primaria como secundaria. La variación de la frecuencia acústica sola cuando se eyectan solamente gotitas primarias tiene un efecto solamente limitado sobre el volumen de la gotita pero incrementa la velocidad de la gotita. Las figuras 9 y 10 ilustran la variación tanto en la velocidad de la gotita como en el tamaño de la gotita a 26, 30 y 34 MHz, utilizando potencia de entrada variable.

15 Variación de la duración de la ráfaga de tono:

Variación de la duración de la ráfaga de tono:

Como se discutió más arriba, la variación de la duración acústica potencia significativamente la variación en el rango de volumen de fluido eyectado cuando la potencia acústica aplicada es suficiente para eyectar gotitas tanto primaria como secundaria. La variación de la duración de la ráfaga de tono cuando se eyectan solamente gotitas primarias es capaz de variar el diámetro de la gotita en aproximadamente 40%, correspondiente a un cambio en el volumen de gotita de tanto como 300%. Alternativamente, la variación de la duración de la ráfaga de tono puede utilizarse para variar la velocidad de la gotita en más de 100%. Las Figuras 4, 5, 6 y 7 ilustran gráficamente los efectos de variación de la duración de la ráfaga de tono.

25 Desde luego, se entiende que las variaciones óptimas de los parámetros discutidos anteriormente dependerán de los fluidos y lentes específicos seleccionados y tales modificaciones caen perfectamente dentro de las capacidades de una persona experimentada en la técnica.

Realizaciones ilustradas:

30 La Figura 2 ilustra una realización del dispositivo de la invención en vista transversal simplificada. Como sucede con las figuras referenciadas aquí en las cuales partes similares son referenciadas por numerales similares, la Figura 2 no está a escala, y ciertas dimensiones pueden ser exageradas en busca de claridad de la presentación. El dispositivo 31 incluye una pluralidad de reservorios, esto es, al menos dos reservorios, con un primer reservorio indicado en 33 y un segundo reservorio indicado en 35, adaptado cada uno para contener un fluido que tiene una superficie de fluido, por ejemplo, un primer fluido 34 y un segundo fluido 36 que tienen superficies de fluido indicados respectivamente en 37 y 39. Los fluidos 34 y 36 pueden ser el mismo o diferentes. Como se muestra, los reservorios son sustancialmente de construcción idéntica de manera que sean sustancialmente indistinguibles acústicamente, pero la construcción idéntica no es un requisito. Los reservorios se muestran como componentes retirables separados, pero si se desea, pueden estar fijados dentro de una placa u otro sustrato. Por ejemplo, la pluralidad de reservorios puede comprender pozos individuales en una placa de pozos, óptimamente aunque no necesariamente dispuestos en un arreglo. Cada uno de los reservorios 33 y 35 es preferiblemente simétrico axialmente como se muestra, teniendo paredes 41 y 43 verticales que se extiende más arriba desde las bases 45 y 47 circulares del reservorio y terminando en aberturas 49 y 31, respectivamente, aunque pueden utilizarse otras formas de reservorio. El material y espesor de cada base de reservorio debería ser tal que la radiación acústica pueda ser transmitida a través del mismo y hacia el fluido contenido dentro de los reservorios.

45 El dispositivo también incluye un eyector 53 acústico que comprende un generador 55 de radiación acústica para generar radiación acústica y un medio 57 de enfoque para enfocar la radiación acústica en un punto focal dentro del fluido desde el cual se va a eyectar una gotita, cerca de la superficie del fluido. Como se muestra en la Figura 3, el medio 57 de enfoque puede comprender una pieza sólida sencilla que tiene una superficie 59 cóncava para enfocar la radiación acústica, pero el medio de enfoque puede ser construido de otras formas como se discute más adelante.

50 El eyector 53 acústico está adaptado así para generar y enfocar la radiación acústica de tal manera que se eyecte una gotita de fluido desde cada una de las superficies 37 y 39 de fluido cuando se acoplan acústicamente a los reservorios 33 y 35 y así a los fluidos 34 y 36, respectivamente. El generador 55 de radiación acústica y el medio 57 de enfoque pueden funcionar como una unidad individual controlada por un controlador individual, o pueden ser controlados independientemente dependiendo del rendimiento deseado del dispositivo. Típicamente, se prefieren diseños de eyectores individuales frente a diseños de eyectores múltiples porque la exactitud de la colocación y consistencia de la gotita en tamaño y velocidad de la gotita se logran más fácilmente con un eyector individual.

Como será evidente para los expertos en la técnica, cualquiera de una variedad de medios de enfoque puede emplearse en conjunción con la presente invención en tanto el lente tenga un número F de más de aproximadamente 2. Por ejemplo, pueden utilizarse una o más superficies curvadas para dirigir la radiación acústica a un punto focal cercano a una superficie de fluido. Una técnica tal está descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 4,308,547 de Lovelady et al. Se han incorporado medios de enfoque con una superficie curvada en la construcción de transductores acústicos disponibles comercialmente tales como los manufacturados por Panametrics Inc. (Waltham, MA). Además, los lentes Fresnel son conocidas en la técnica para dirigir energía acústica a una distancia focal predeterminada desde un objeto plano. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,041,849 de Quate et al. Los lentes Fresnel pueden tener un perfil de fase radial que difracte una porción sustancial de energía acústica hacia un orden de difracción predeterminado en ángulos de difracción que varían radialmente con respecto al lente. Los ángulos de difracción deberían ser seleccionados para enfocar la energía acústica dentro del orden de difracción sobre un plano de objeto deseado.

También hay un cierto número de maneras de acoplar acústicamente el eyector 53 a cada reservorio individual y así al fluido dentro del mismo. Una de tales metodologías es a través del contacto directo tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 4,308,547 de Lovelady et al., en donde un medio de enfoque construido a partir de un cristal hemisférico que tiene electrodos segmentados es sumergido en un líquido que va a ser eyectado. La patente antes mencionada divulga adicionalmente que los medios de enfoque pueden ser posicionados en o por debajo de la superficie del líquido. Sin embargo, esta metodología para acoplar acústicamente el medio de enfoque al fluido es indeseable cuando el eyector se utiliza para eyectar fluidos diferentes en una pluralidad de contenedores o reservorios, puesto que se requeriría limpieza repetida del medio de enfoque con el fin de evitar contaminación cruzada. El proceso de limpieza alargaría necesariamente el tiempo de transición entre cada evento de eyección de gotita. Además, en tal método, el fluido se adheriría al eyector a medida que es retirado de cada contenedor, desperdiciando material que puede ser costoso o escaso.

Así, una metodología preferida sería acoplar acústicamente el eyector a los reservorios y fluidos del reservorio sin poner en contacto ninguna porción del eyector, por ejemplo, el medio de enfoque, con ninguno de los fluidos que va a ser eyectado. Con este fin, la presente invención provee un medio de posicionamiento opcional del eyector para posicionar el eyector en acoplamiento acústico controlado y repetible con cada uno de los fluidos en los reservorios para eyectar gotitas desde los mismos sin sumergir el eyector en el mismo. Esto involucra típicamente un contacto directo o indirecto entre el eyector y la superficie externa de cada reservorio. Cuando se utiliza contacto directo con el fin de acoplar acústicamente el eyector a cada reservorio, se prefiere que el contacto directo sea completamente conformado para asegurar una transferencia de energía acústica eficiente. Esto es, el eyector y el reservorio deberían tener superficies correspondientes adaptadas para hacer coincidir el contacto. Así, si se alcanza el acoplamiento acústico entre el eyector y el reservorio a través del medio de enfoque, es deseable que el reservorio tenga una superficie externa que corresponda al perfil de superficie del medio de enfoque. Sin un contacto conformado, la eficacia y la exactitud de la transferencia de energía acústica pueden verse comprometida. Además, puesto que muchos medios de enfoque tienen una superficie curvada, la metodología de contacto directo puede requerir el uso de reservorios que tengan una superficie inversa especialmente formada.

De forma óptima, el acoplamiento acústico se alcanza entre el eyector y cada uno de los reservorios a través de contacto indirecto, como se ilustra en la Figura 2A. En la figura, un medio 61 de acoplamiento acústico es colocado entre el eyector 63 y la base 45 del reservorio 33, localizados el eyector y el reservorio a una distancia predeterminada uno de otro. El medio de acoplamiento acústico puede ser un fluido de acoplamiento acústico, preferiblemente un material acústicamente homogéneo en contacto conformado con tanto el medio 67 de enfoque acústico como con cada reservorio. Además, es importante asegurar que el medio fluido está sustancialmente libre de material que tenga propiedades acústicas diferentes que el medio de fluido mismo. Como se muestra, el primer reservorio 33 está acoplado acústicamente al medio 67 de enfoque acústico de tal forma que el generador de radiación acústica genera una onda acústica, la cual a su vez es dirigida por el medio 67 de enfoque hacia el medio 61 de acoplamiento acústico, el cual transmite entonces la radiación acústica al reservorio 33.

Durante la operación, los reservorios 33 y 35 del dispositivo son llenados cada uno con primero y segundo fluidos 34 y 36, respectivamente, como se muestra en la Figura 2. El eyector 53 acústico es posicionable por medio de un medio 63 de posicionamiento del eyector, mostrado por debajo del reservorio 33, con el fin de alcanzar acoplamiento acústico entre el eyector y el reservorio a través del medio 61 de acoplamiento acústico. El sustrato 65 está posicionado por encima y en proximidad al primer reservorio 33 de tal manera que una superficie del sustrato, mostrada en la Figura 2 como superficie 71 en el lado inferior, está frente al reservorio y es sustancialmente paralela a la superficie 37 del fluido 44 dentro del mismo. Una vez que el eyector, el reservorio y el sustrato están en alineamiento apropiado, se activa el generador 55 de radiación acústica para producir radiación acústica que es dirigida hacia el medio 57 de enfoque a un punto 67 focal cerca a la superficie 37 de fluido del primer reservorio. Como resultado, la gotita 69 es eyectada desde la superficie 37 del fluido sobre un sitio designado en la superficie 71 inferior del sustrato. La gotita eyectada puede ser retenida sobre la superficie del sustrato solidificándose sobre el mismo después del contacto; en tal realización, es necesario mantener el sustrato a una temperatura baja, esto es, una temperatura que de como resultado la solidificación de la gotita después del contacto. Alternativamente, o además, una unidad estructural

molecular dentro de la gotita se une a la superficie del sustrato después del contacto, a través de adsorción, inmovilización física, o enlace covalente.

Luego, como se muestra en la Figura 2B, un medio 70 de posicionamiento de sustrato reposiciona el sustrato 65 sobre el reservorio 35 con el fin de recibir una gotita desde el mismo en un segundo sitio designado. La Figura 2B también muestra que el eyector 53 ha sido reposicionado por el medio 63 del posicionamiento del eyector por debajo del reservorio 35 y en relación de acoplamiento acústico al mismo por virtud del medio 61 de acoplamiento acústico. Una vez que se ha alineado apropiadamente, como se muestra en la Figura 2B, el generador 55 de radiación acústica del eyector 53 es activado para producir radiación acústica que es dirigida entonces por medios 57 de enfoque a un punto focal dentro del fluido 36 cercana a la superficie 39 del fluido, eyectando por lo tanto la gotita 73 sobre el sustrato. Es evidente que tal operación es ilustrativa de cómo el dispositivo de la invención puede ser utilizado para eyectar una pluralidad de fluidos desde los reservorios con el fin de formar un patrón, por ejemplo, un arreglo, sobre la superficie 71 del sustrato. Debe ser igualmente evidente que el dispositivo puede ser adaptado para eyectar una pluralidad de gotitas desde uno o más reservorios sobre el mismo sitio de la superficie de sustrato. En otra realización, el dispositivo es construido de tal manera que permita la transferencia de fluidos entre placas de pozo, en cuyo caso el sustrato comprende en una vista plana superior, y los reservorios que contienen fluidos son pozos individuales en una placa de pozos de reservorio. La Figura 3 ilustra tal dispositivo, en el cual cuatro pozos 33, 35, 93 y 95 individuales en la placa 32 de pozos de reservorio sirven como reservorios de fluido para contener un fluido que va a ser eyectado, y el sustrato comprende una placa 65 de pozos más pequeña para cuatro pozos individuales indicados en 75, 76, 77 y 78. Aunque la placa de sustrato está representada como un placa de pozos más pequeña que la placa de pozos de reservorio, esto no debe considerarse como una limitación, puesto que la transferencia puede tener lugar entre placas de pozo de cualesquiera dos tamaños. La Figura 3A ilustra la placa de pozos del reservorio y la placa de pozos de sustrato en una vista plana superior. Como se muestra, cada una de las placas de pozo contiene cuatro pozos dispuestos en un arreglo de dos en dos. La Figura 3B ilustra el dispositivo de la invención en el cual la placa de pozos de reservorio y la placa de pozos de sustrato se muestran en una vista en sección transversal a lo largo de los pozos 33, 35 y 75, 77, respectivamente. Como sucede en la Figura 2, los pozos 33 y 35 de reservorio contienen fluidos 34 y 36 respectivamente que tienen superficies de fluido indicadas respectivamente en 37 y 39. En los materiales y el diseño de los pozos de la placa de pozos del reservorio son similares a los de los reservorios ilustrados en la Figura 2. Por ejemplo, los pozos de reservorio mostrados en la Figura 3B son de construcción sustancialmente idéntica de manera que sean acústicamente indistinguible de manera sustancial. En esta realización también, las bases de los reservorios son de un material y espesor de tal manera que permitan la transmisión eficiente de radiación acústica a través de los mismos hacia el fluido contenido dentro de los reservorios.

El dispositivo de la Figura 3 incluye también un eyector 53 acústico que tiene una construcción similar a la del eyector ilustrado en la Figura 2, esto es, el eyector está compuesto de un medio 55 de generación acústica y un medio 57 de enfoque. La Figura 3B muestra el eyector acoplado acústicamente a un pozo de reservorio a través de contacto indirecto; esto es, un medio 61 de acoplamiento acústico está colocado entre el eyector 63 y la placa 32 de pozos de reservorio, esto es, entre la superficie 59 curvada del medio 57 de enfoque acústico y la base 45 del primer pozo 33 de reservorio. Como se muestra, el primer pozo 33 de reservorio está acoplado acústicamente al medio 67 de enfoque acústico de tal manera que la radiación acústica generada en una dirección en general hacia arriba es dirigida por el medio 67 de enfoque hacia el medio 61 de acoplamiento acústico, el cual transmite entonces la radiación acústica al pozo 33 de reservorio.

Durante la operación, cada uno de los pozos de reservorio está lleno preferiblemente con un fluido diferente. Como se muestra, los pozos 33 y 35 del reservorio del dispositivo están llenos cada uno con un primer fluido 34 y un segundo fluido 36, como la Figura 2, para formar superficies 37 y 39 de fluido, respectivamente. La Figura 3A muestra que el eyector 63 está posicionado por debajo del pozo 33 de reservorio mediante un medio 63 de posicionamiento del eyector con el fin de alcanzar acoplamiento acústico con el mismo a través del medio 61 de acoplamiento acústico. El primer pozo 75 de sustrato de la placa 65 de pozos de sustrato está posicionado por encima del primer pozo 33 del reservorio con el fin de recibir una gotita eyectada desde el primer pozo de reservorio. Una vez que el eyector, el reservorio del sustrato están en alineamiento apropiado, el generador de radiación acústica es activado para producir una onda acústica que es enfocada por el medio de enfoque para dirigir la onda acústica al punto 67 focal cerca a la superficie 37 del fluido. Como resultado, la gotita 69 es eyectada desde la superficie 37 de fluido hacia el primer pozo 75 de sustrato de la placa 65 de pozos de sustrato. La gotita es retenida en la placa de pozos de sustrato solidificándose sobre el mismo después del contacto, en virtud de la baja temperatura a la cual se mantiene la placa de pozos de sustrato. Esto es, la placa de pozos de sustrato está asociada preferiblemente con un medio de enfriamiento (no mostrado) para mantener la superficie de sustrato a una temperatura que da como resultado la solidificación de la gotita después del contacto.

Luego, como se muestra en la Figura 3C, la placa 65 del pozo de sustrato es reposicionada por un medio 70 de posicionamiento de sustrato de tal forma que el pozo 77 de sustrato está localizado directamente sobre el pozo 35 de reservorio con el fin de recibir una gotita desde el mismo. La Figura 3C también muestra que el eyector 53 ha sido reposicionado por debajo del pozo 35 de reservorio por el medio de posicionamiento del eyector de tal manera que se acople acústicamente al eyector y el reservorio a través del medio 61 de acoplamiento acústico. Puesto que la placa de pozos del sustrato y la placa de pozos de reservorio tienen tamaños diferentes, solamente hay correspondencia,

no identidad, entre el movimiento del medio de posicionamiento del eyector y el movimiento de la placa de pozos de sustrato. Una vez se ha alineado apropiadamente como se muestra en la Figura 3C, el generador 55 de radiación acústica del eyector 53 es activado para producir una onda acústica que es dirigida entonces por el medio 57 de enfoque a un punto focal cerca de la superficie 39 de fluido desde la cual se eyecta la gotita 73 sobre el segundo pozo de la placa de pozos de sustrato. Debería ser evidente que tal operación es ilustrativa de cómo el dispositivo de la invención puede ser utilizado para transferir una pluralidad de fluidos desde una placa de pozos a otra de un tamaño diferente. Una persona de experiencia normal en el arte, reconocerá que este tipo de transferencia puede llevarse a cabo incluso cuando tanto el eyector como el sustrato están en movimiento continuo. Debe ser además evidente que una variedad de combinaciones de reservorios, placas de pozo y/o sustratos puede utilizarse en el uso de dispositivos de la invención para acoplarse en la transferencia de fluidos. También debe ser evidente adicionalmente que cualquier reservorio puede ser llenado con un fluido a través de la eyección acústica antes de desplegar el reservorio para transferencia de fluidos adicionales, por ejemplo, para deposición de arreglos.

Como se discutió anteriormente, bien sea reservorios individuales, por ejemplo, retirables, o placas de pozo pueden utilizarse para contener fluidos que van a ser eyectados, en los que los reservorios o los pozos de la placa de pozos son de manera preferible sustancialmente indistinguibles acústicamente uno de otro. También, a menos que se pretenda que el eyector este sumergido en el fluido que va a ser eyectado, los reservorios o placas de pozo deben tener propiedades de transmisión acústica suficientes para permitir que la radiación acústica del eyector sea transportada a las superficies de los fluidos que van a ser eyectados. Típicamente, esto involucra proveer reservorios o bases de pozos que sean suficientemente delgadas para permitir que la radiación acústica viaje a través de los mismos sin disipación inaceptable. Además, el material utilizado en la construcción de los reservorios debe ser compatible con los fluidos contenidos en los mismos. Así, si se pretende que los reservorios o pozos contengan un solvente orgánico tal como acetonitrilo, polímeros que se disuelvan o difundan en acetonitrilo serían inadecuados para el uso en la formación de los reservorios o placas de pozo. Para fluidos basados en agua, hay un cierto número de materiales adecuados para la construcción de los reservorios se incluyen, pero no se limitan a, cerámicas tales como óxido de silicio y óxido de aluminio, metales tales como acero inoxidable y platino, y polímeros tales como poliéster y politetrafluoroetileno.

Muchas placas de pozos adecuadas para uso en el dispositivo de la invención están disponibles comercialmente y pueden contener, por ejemplo, 96, 384 o 1536 pozos por placa de pozos. Los fabricantes de placas bien adecuadas para uso en el dispositivo de la invención incluyen Corning Inc. (Coming, New York) y Greiner America, Inc. (Lake Mary, Florida). Sin embargo, la disponibilidad de tales placas de pozo disponibles comercialmente no evita la manufactura y el uso de placas de pozos hechas localmente que contengan al menos aproximadamente 10.000 pozos, o tanto como 100.000 pozos o más. Para aplicaciones de formación de arreglos, se espera que puedan emplearse aproximadamente de 100.000 a aproximadamente 4.000.000 de reservorios. Además, con el fin de reducir la cantidad de movimiento necesario para alinear el eyector con cada reservorio o pozo de reservorio, es preferible que el centro de cada reservorio esté localizado no más de aproximadamente 1 centímetro, preferiblemente no más de aproximadamente 1 milímetro y de manera óptima no más de aproximadamente 0.5 milímetros de cualquier otro centro de reservorio.

Además, el dispositivo puede ser adaptado para eyectar fluidos de virtualmente cualquier tipo y cantidad deseados. El fluido puede ser acuoso y/o no acuoso. Los fluidos no acuosos incluyen, por ejemplo, agua, solventes orgánicos y líquidos lipídicos y, debido a que la invención se adapta fácilmente para uso con altas temperaturas, pueden ser utilizados fluidos tales como metales líquidos, materiales cerámicos y vidrios; véase, por ejemplo, solicitud de patente de los Estados Unidos copendiente publicada No. US 2002/0037375 ("Focused Acoustic Energy Method and Device for Generating Droplets of Immiscible Fluids") inventores Ellson, y Mutz, y Foote, publicada el 28 de marzo del 2002, y asignada a Picoliter, Inc. (Mountain View, California). La capacidad de producir gotitas finas de tales materiales en agudo contraste con la tecnología piezoeléctrica, hasta ahora puesto que los sistemas piezoeléctricos se comportan de manera subóptima a temperaturas elevadas. Adicionalmente, debido a la precisión que es posible utilizando la tecnología de la invención, el dispositivo puede ser utilizado para eyectar gotitas de un reservorio adaptado para contener no más de aproximadamente 100 nanolitros de fluido, preferiblemente no más de 10 nanolitros de fluido. En ciertos casos, el eyector puede ser adaptado para eyectar una gotita de un reservorio adaptado para contener aproximadamente de 1 a 100 nanolitros de fluido. Esto es particularmente útil cuando el fluido que va a ser eyectado contiene biomoléculas raras o costosas, en el que puede ser deseable eyectar gotitas que tengan un volumen de hasta aproximadamente 1 picolitro. La capacidad de los lentes con números F grandes para eyectar gotas de reservorios en donde la relación de la distancia a la superficie del fluido es mucho mayor que la apertura contenida dentro de la base del reservorio, esto es, 3 a 5 veces mayor, permite la eyección de gotitas adaptadas para contener entre 0.01 picolitros a 20 picolitros.

De lo anterior, es evidente que diversos componentes del dispositivo pueden requerir control o sincronización individual para formar un arreglo sobre un sustrato. Por ejemplo, el medio de posicionamiento del eyector puede ser adaptado para eyectar gotitas desde cada reservorio en una secuencia predeterminada asociada con un arreglo que va a ser preparado sobre una superficie de sustrato. De manera similar, el medio de posicionamiento del sustrato para posicionar en la superficie de sustrato con respecto al eyector pueda adaptarse para posicionar la superficie del sustrato para recibir gotitas en un patrón o arreglos sobre el mismo. Uno cualquiera o ambos medios de

5 posicionamiento, esto es, el medio de posicionamiento del eyector y el medio de posicionamiento de sustrato, pueden ser contruidos a partir de, por ejemplo, palancas, poleas, engranajes, una combinación de los mismos, u otros medios mecánicos conocidos para una persona de experiencia normal en la técnica. Es preferible asegurar que hay una correspondencia entre el movimiento del sustrato, el movimiento del eyector, y la activación del eyector para asegurar una formación de patrón apropiada.

10 Además, el dispositivo puede incluir otros componentes que potencian el rendimiento. Por ejemplo, tal como se hizo alusión más arriba, el dispositivo puede comprender adicionalmente medios de enfriamiento para disminuir la temperatura de la superficie del sustrato para asegurar, por ejemplo, que las gotitas eyectadas se adhieran al sustrato. Los medios de enfriamiento pueden ser adaptados para mantener la superficie del sustrato a una temperatura que permita que el fluido se solidifique parcial o preferiblemente de forma sustancial después de que el fluido entre en contacto con el mismo. En el caso de fluidos acuosos el medio de enfriamiento debería tener la capacidad de mantener la superficie del sustrato a aproximadamente 0°C. Además, la aplicación repetida de energía acústica a un reservorio de fluido puede dar como resultado el calentamiento del fluido. El calentamiento desde luego puede dar como resultado cambios indeseados en las propiedades de fluido tales como viscosidad, tensión superficial y densidad. Así, el dispositivo puede comprender adicionalmente medios para mantener el fluido en los reservorios a una temperatura constante. El diseño y construcción de tal medio para mantenimiento de la temperatura son conocidos para una persona normal en la técnica y pueden comprender, por ejemplo, componentes tales como un elemento de calentamiento, un elemento de enfriamiento, o una combinación de los mismos. Para muchas aplicaciones de deposición biomolecular, se desea en general que el fluido que contiene las biomoléculas se mantenga a una temperatura constante sin desviarse más de aproximadamente 1°C o 2°C de la misma. Además, para un fluido biomolecular que es particularmente sensible al calor, se prefiere que el fluido sea mantenido a una temperatura que no exceda aproximadamente 10°C por encima el punto de fusión del fluido, preferiblemente a una temperatura que no exceda aproximadamente 5°C por encima el punto de fusión del fluido. Así, por ejemplo, cuando el fluido que contiene la biomolécula es acuoso, puede ser óptimo mantener el fluido a aproximadamente 4°C durante la eyección.

25 El dispositivo de la invención permite la eyección de gotitas a una rata de al menos aproximadamente 1.000.000 de gotitas por minuto desde el mismo reservorio, y a una rata de al menos aproximadamente 100.000 gotas por minuto desde diferentes reservorios. Además, la tecnología de posicionamiento actual permite que el medio de posicionamiento del eyector se mueva de un reservorio a otro rápidamente y de manera controlada, permitiendo de esta manera una eyección rápida y controlada de los diferentes fluidos. Esto es, la tecnología actual disponible comercialmente permite que el eyector sea movido desde un reservorio al otro, con acoplamiento acústico repetible y controlado en cada reservorio, en menos de aproximadamente 0.1 segundo para un medio de posicionamiento de alto rendimiento y en menos de aproximadamente 1 segundo para un medio de posicionamiento ordinario. Un sistema diseñado a medida permitirá que el eyector sea movido de un reservorio a otro con acoplamiento acústico repetible y controlado en menos de aproximadamente 0.01 segundos. Con el fin de proveer un sistema diseñado a la medida es importante tener en mente que hay dos clases básicas de movimiento: pulso y continuo. El movimiento en pulsos involucra etapas discretas de movimiento de un eyector hacia la posición, emitiendo energía acústica, y moviendo el eyector a la siguiente posición; de nuevo utilizando un medio de posicionamiento de alto rendimiento con tal método permite acoplamiento acústico repetible y controlado en cada reservorio en menos de 0.1 segundos. Un diseño de movimiento continuo, por otro lado, mueve el eyector y los reservorios de manera continua, aunque no a la misma velocidad y provee eyección durante el movimiento. Puesto que la anchura del pulso es muy corta, este tipo de proceso permite transiciones de reservorio por encima de 10 Hz, e incluso transiciones de reservorio por encima de 1.000 Hz.

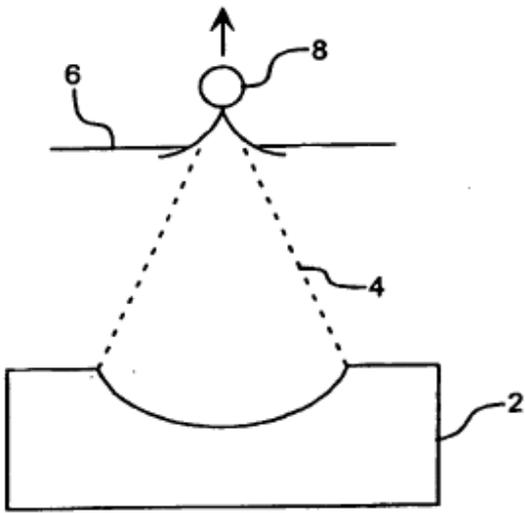
Debe entenderse que a la vez que la invención ha sido descrita en conjunción con las realizaciones específicas preferidas, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones serán evidentes para los experimentados en la técnica a la cual es pertinente la invención.

**REIVINDICACIONES**

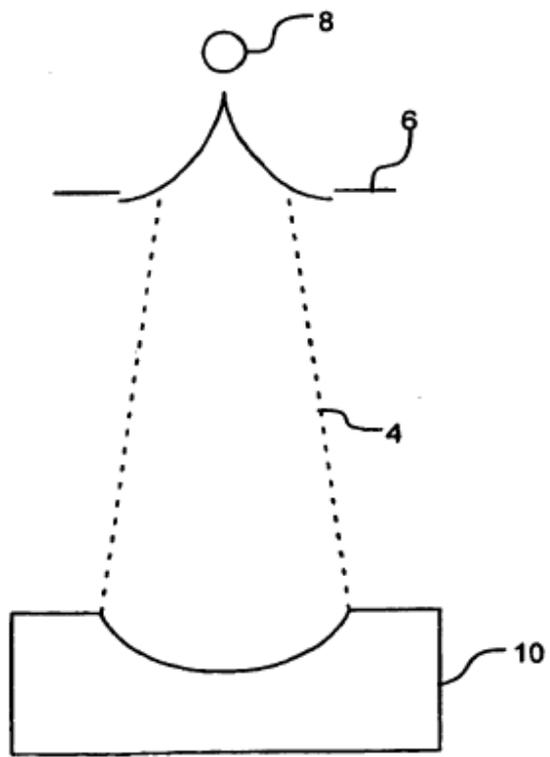
1. Un dispositivo para eyectar acústicamente una gotita de fluido desde un reservorio hacia un sitio designado sobre una superficie de sustrato, que comprende:
- 5 (a) un reservorio (33) adaptado para contener un fluido (34) que tiene una base y tiene una apertura en su base que permite la conducción de energía acústica a través del mismo en una manera sustancialmente uniforme, teniendo dicha apertura una anchura en sección transversal; y
- 10 (b) un eyector (53) que comprende un generador (55) de radiación acústica para generar radiación acústica y un medio (57) de enfoque capaz de enfocar la radiación acústica generada a un punto (67) focal cerca de la superficie del fluido a través de la apertura en la base del reservorio para emitir una gotita (69) de fluido desde el reservorio,
- en el que la relación de distancia entre el punto focal y la apertura de la anchura de la sección transversal de la apertura es mayor que 2:1.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:
- 15 (c) un medio para posicionar el eyector (53) en relación de acoplamiento acústico con el reservorio (33).
3. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha relación es mayor que 3:1.
4. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha relación es mayor que 4:1.
5. El dispositivo de la reivindicación 2, que comprende una pluralidad de reservorios adaptado cada uno para contener un fluido, y en el que el dispositivo es capaz de eyectar una gotita de fluido desde cada uno de la pluralidad de reservorios hacia una pluralidad de sitios designados sobre la superficie de sustrato.
- 20 6. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que cada uno de los reservorios es retirable desde el dispositivo.
7. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que cada reservorio comprende un pozo individual en una placa de pozos.
8. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que el sitio designado sobre la superficie de sustrato comprende un pozo individual en una placa de pozos.
- 25 9. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que los reservorios están dispuestos en un arreglo.
10. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que los reservorios son sustancialmente indistinguibles acústicamente.
11. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que al menos uno de los reservorios está adaptado para contener no más de aproximadamente 100 nanolitros de fluido.
12. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que al menos uno de los reservorios contiene un fluido.
- 30 13. El dispositivo de la reivindicación 12, en el que cada reservorio contiene un fluido diferente.
14. El dispositivo de la reivindicación 12, en el que al menos uno de los reservorios contiene un fluido acuoso.
15. El dispositivo de la reivindicación 12, en el que al menos uno de los reservorios contiene un fluido no acuoso.
16. El dispositivo de la reivindicación 12, en el que al menos uno de los reservorios contiene dos fluidos sustancialmente inmiscibles.
- 35 17. El dispositivo de la reivindicación 15, en donde el fluido no acuoso comprende un solvente orgánico.
18. El dispositivo de la reivindicación 17 en el que el solvente orgánico es seleccionado del grupo consistente de hidrocarburos halogenados, alcoholes, aldehídos, amidas, aminas, ácidos carboxílicos, ésteres, éteres, hidrocarburos halogenados, hidrocarburos, lactamas, nitrilos, nitratos orgánicos, sulfuros orgánicos y mezclas de los mismos.
- 40 19. El dispositivo de la reivindicación 12, donde al menos uno de los reservorios que contiene fluido contiene una biomolécula.

20. El dispositivo de la reivindicación 19, en el que la biomolécula es seleccionada del grupo consistente de nucleótidos, péptidos, oligómeros y polímeros.
21. El dispositivo de la reivindicación 19, en el que la biomolécula está unida a una célula.
22. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que el medio de posicionamiento está adaptado para reposicionar repetidamente al eyector de tal manera que permita la eyección de una gotita desde cada uno de los reservorios.
23. El dispositivo de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente un medio para mantener un fluido en cada reservorio a una temperatura constante.
24. El dispositivo de la reivindicación 22, que comprende adicionalmente un medio de posicionamiento de sustrato para posicionar la superficie de sustrato con respecto al eyector.
- 10 25. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente medios de enfriamiento para disminuir la temperatura de la superficie de sustrato.
26. El dispositivo de la reivindicación 25, en el que el medio de enfriamiento está adaptado para mantener la superficie de sustrato a una temperatura que produce que el fluido depositado se solidifique sustancialmente después de entrar en contacto con la superficie de sustrato.
- 15 27. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que la relación de acoplamiento acústico comprende posicionar el eyector de tal manera que la radiación acústica es generada y enfocada externa al reservorio.
28. El dispositivo de la reivindicación 27, en el que la relación de acoplamiento acústico entre el eyector y el fluido en el reservorio se establece proveyendo un medio acústicamente conductor entre el eyector y el reservorio.
29. El dispositivo de la reivindicación 5, que comprende un eyector sencillo.
- 20 30. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de enfoque tiene un número F mayor que 2.
31. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de enfoque tiene un número F de 3 o 4.
- 25 32. Un método para eyectar un fluido desde un reservorio de fluido hacia sitios designados sobre una superficie de sustrato, que comprende:
- (a) proveer un dispositivo que consiste de:
- (i) un reservorio que contiene un primer fluido, teniendo dicho reservorio una base y una apertura en su base que permite la conducción de energía acústica a través del mismo en una manera sustancialmente uniforme, teniendo dicha apertura una anchura de sección transversal; y
- 30 (ii) un eyector que comprende un generador de radiación acústica para generar radiación acústica y un medio de enfoque capaz de enfocar la radiación acústica generada en un punto (67) focal a través de la apertura en la base del reservorio para emitir una gotita desde una superficie del primer fluido contenido dentro del reservorio de fluido,
- en el que la relación de la distancia entre el punto focal y la apertura con respecto a la anchura de la sección transversal de la apertura es mayor que 2:1;
- 35 (b) posicionar el eyector de tal manera que esté en relación acústicamente acoplada con el reservorio que contiene el fluido, en el que la posición del eyector sitúa el medio de enfoque de tal manera que la energía acústica es enfocada en el punto (67) focal cerca a la superficie del primer fluido; y
- (c) activar el eyector para generar radiación acústica enfocada por el mismo eyectando una gotita del primer fluido desde el reservorio.
- 40 33. El método de la reivindicación 32, en el que dicha relación es mayor que 3:1.
34. El método de la reivindicación 32, en el que dicha relación es mayor que 4:1.

35. El método de la reivindicación 32, en el que el dispositivo comprende una pluralidad de reservorios adaptado cada uno para contener un fluido, y en el que el dispositivo es capaz de eyectar una gotita de fluido desde cada uno de la pluralidad de reservorios hacia una pluralidad de sitios designados sobre la superficie de sustrato y el método comprende adicionalmente:
- 5 (d) posicionar el eyector de tal manera que esté en relación acústicamente acoplada con un segundo reservorio que contiene un segundo fluido; y
- (e) activar el eyector como en la etapa (b) para eyectar una gotita del segundo fluido desde el segundo reservorio hacia un segundo sitio designado sobre la superficie de sustrato.
- 10 36. El método de la reivindicación 35, en el que dos gotitas son eyectadas durante al menos una de las etapas (c) o (e).
37. El método de la reivindicación 32, en el que antes de la etapa (c) una duración de ráfaga de tono de radiación acústica es seleccionada de manera que sea suficiente para alcanzar un tamaño de gotita deseado y durante la etapa (c) el eyector es activado de tal manera que genere una ráfaga de tono de radiación acústica de la duración seleccionada, mediante la cual se eyecta una gotita del tamaño deseado.
- 15 38. El método de la reivindicación 32, en el que antes de la etapa (c) se selecciona una duración de ráfaga de tono de radiación acústica que es suficiente para alcanzar una velocidad de gotita deseada y durante la etapa (c) el eyector es activado de tal manera que genere una ráfaga de tono de radiación acústica de la duración seleccionada, mediante lo cual se eyecta una gotita a la velocidad de gotita deseada.
- 20 39. El método de la reivindicación 35, en el que antes de la etapa (c) se selecciona una duración de ráfaga de tono de radiación acústica que es suficiente para alcanzar un tamaño de gotita deseada y durante la etapa (c) el eyector es activado de tal manera que genere una ráfaga de tono de radiación acústica de la duración seleccionada, con lo cual se eyecta una gotita del tamaño deseado.
- 25 40. El método de la reivindicación 35, en el que antes de la etapa (c) se selecciona una duración de ráfaga de tono de radiación acústica que es suficiente para alcanzar una velocidad de gotita deseada y durante la etapa (c) el eyector es activado de tal manera que genere una ráfaga de tono de radiación acústica de la duración seleccionada, con lo cual se eyecta una gotita a la velocidad de gotita deseada.
41. El método de la reivindicación 35, que comprende adicionalmente repetir las etapas (d) y (e) con uno o más reservorios adicionales que contienen fluido.
- 30 42. El método de la reivindicación 36, en el que al menos dos gotitas eyectadas son depositadas en el mismo sitio designado sobre la superficie de sustrato.
43. El método de la reivindicación 42, en el que las dos gotitas eyectadas son depositadas como primera y segunda gotitas y la segunda gotita es más grande que la primera gotita.
44. El método de la reivindicación 35, en el que cada una de las gotitas eyectadas tienen un volumen de aproximadamente hasta 1 picolitro.
- 35 45. El método de la reivindicación 35, que comprende adicionalmente, antes de cada etapa de activación del eyector, medir el nivel de fluido en el reservorio en relación acústicamente acoplada con el eyector.
46. El método de la reivindicación 45, en el que cada etapa de medición se lleva a cabo acústicamente.
47. El método de la reivindicación 46, en el que cada etapa de medición se lleva a cabo utilizando radiación acústica del eyector.



**FIG. 1A**



**FIG. 1B**

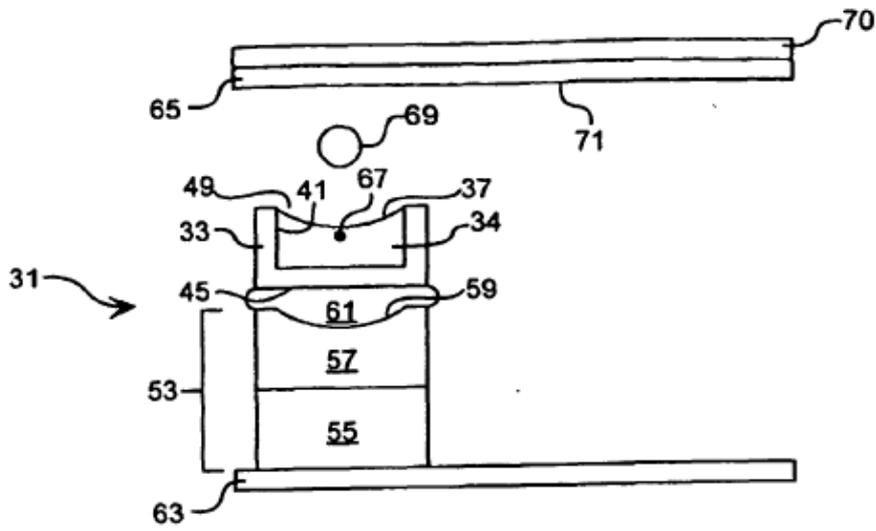


FIG. 2A

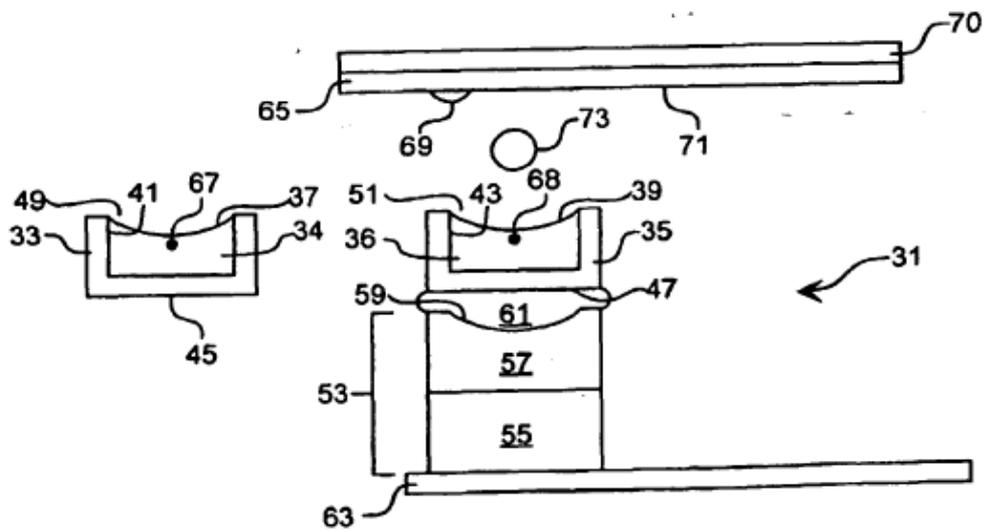
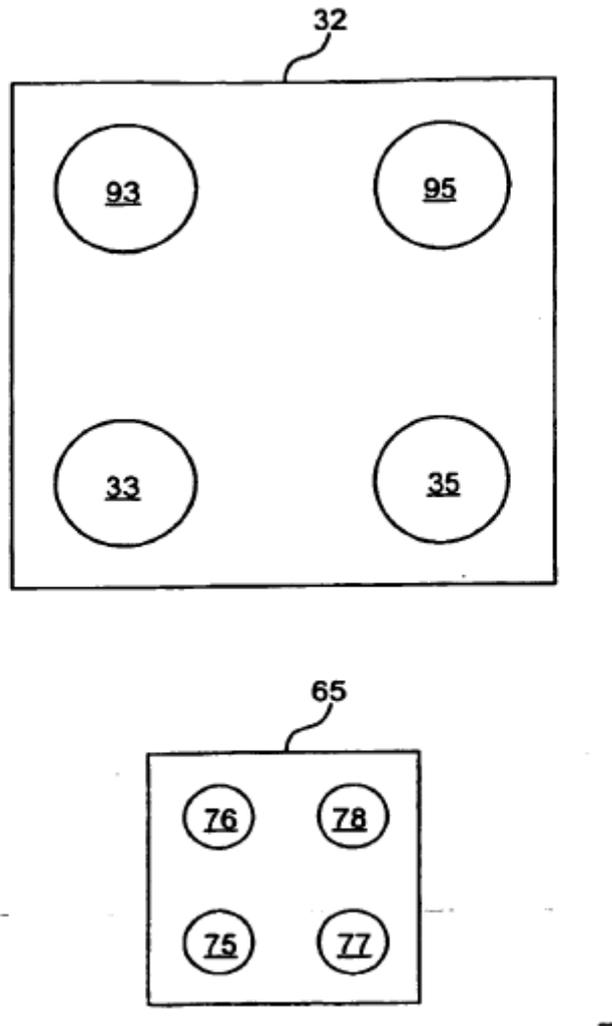


FIG. 2B



**FIG. 3A**



Volumen de gotita vs. longitud de ráfaga de tono  
Lente F3, Poder a 0.8 dB por encima del umbral - Sin satélites

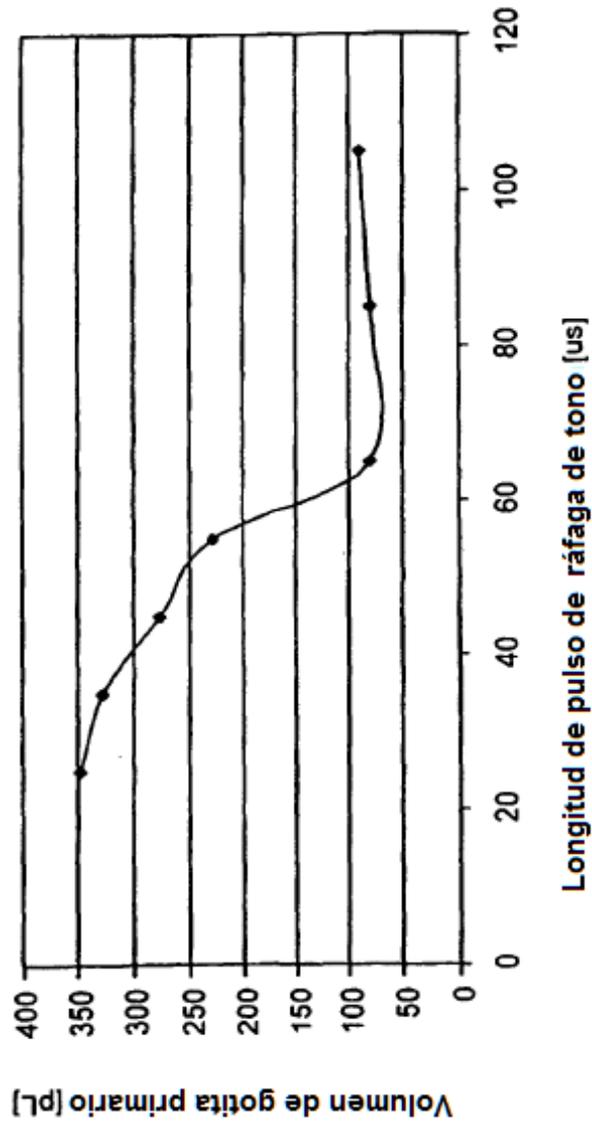
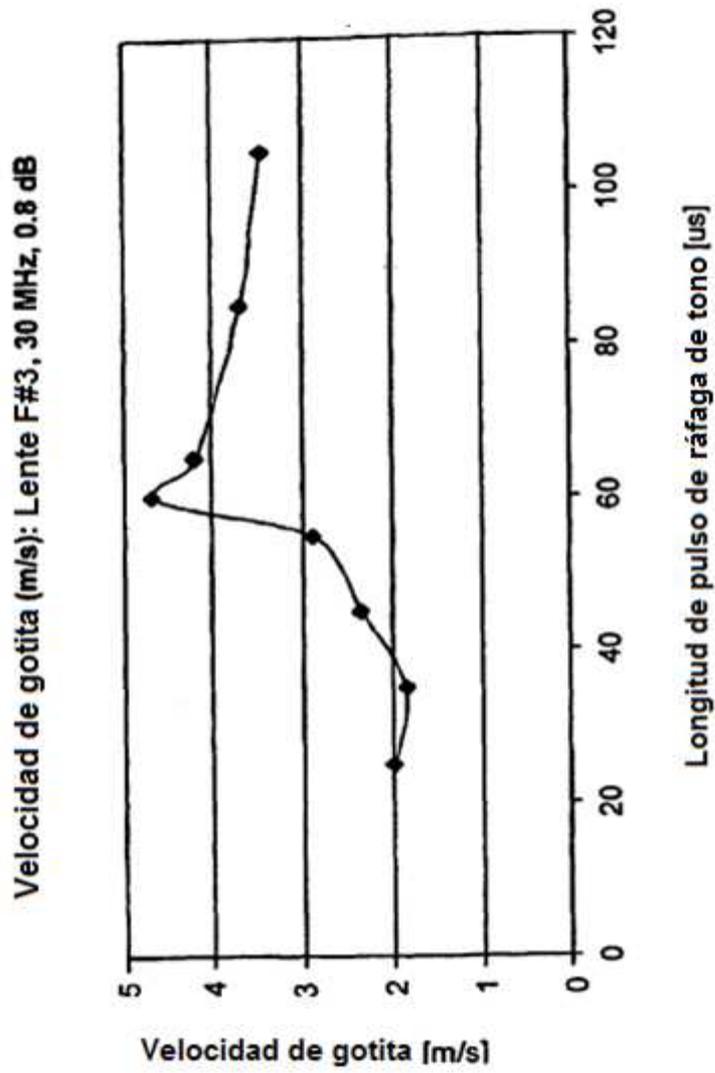


FIG. 4



**FIG. 5**

Volumen de eyección total (Primaria + Satélite):  
Lente F#3, 26 MHz, 1.6 dB, H2O Duración

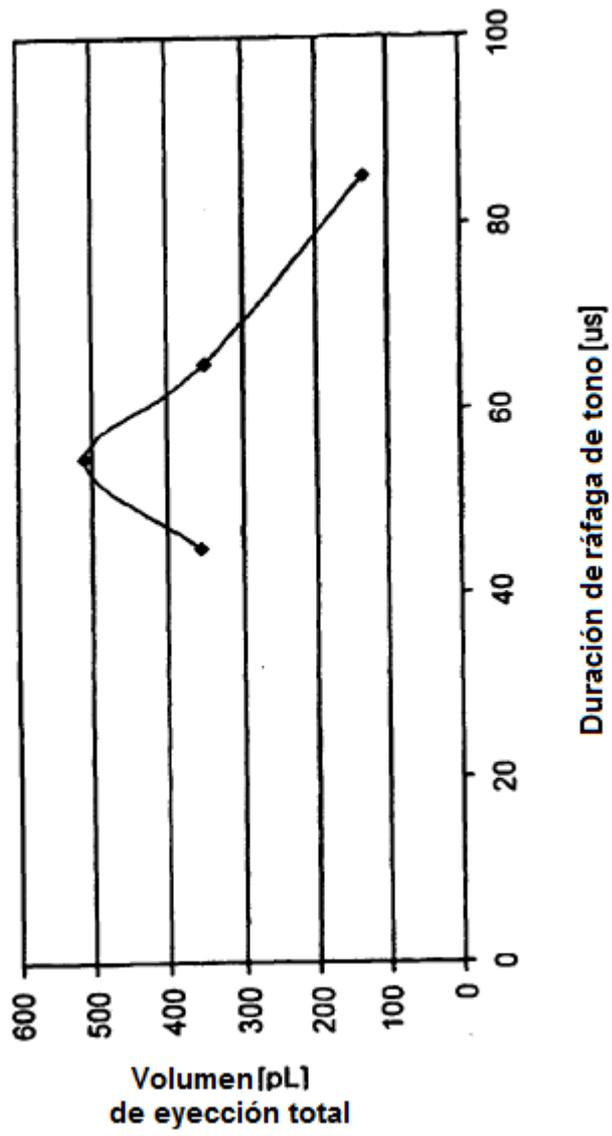


FIG. 6

Volumen del evento de eyección total vs. Frecuencia acústica:  
Lente F3, 65 mseg ráfaga de tono H<sub>2</sub>O

- Volumen de gotita primaria a 0.8 dB por encima del umbral [pL]
- Primaria + Volumen de gotita satélite a 1.6 dB por encima del umbral [pL]

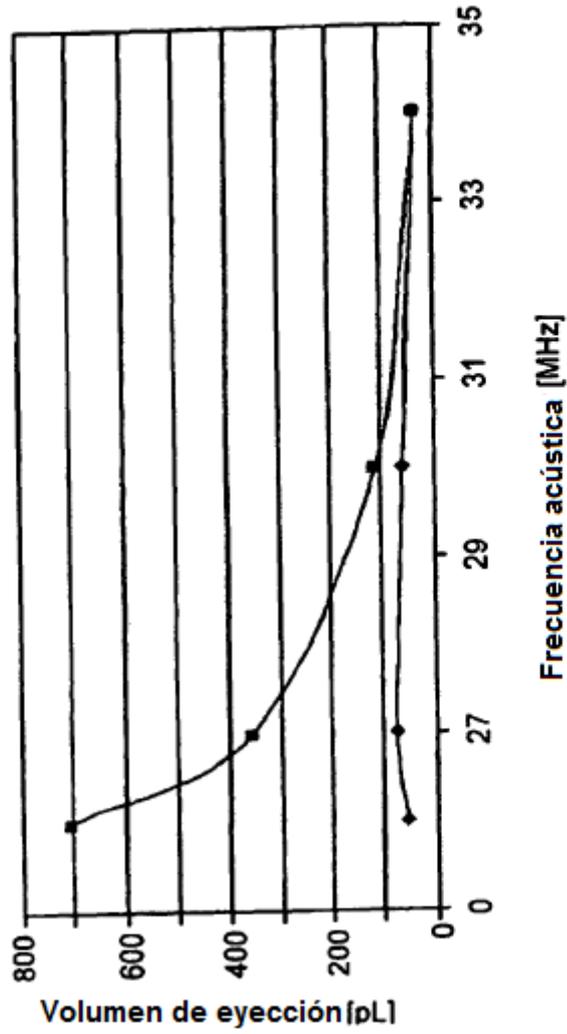
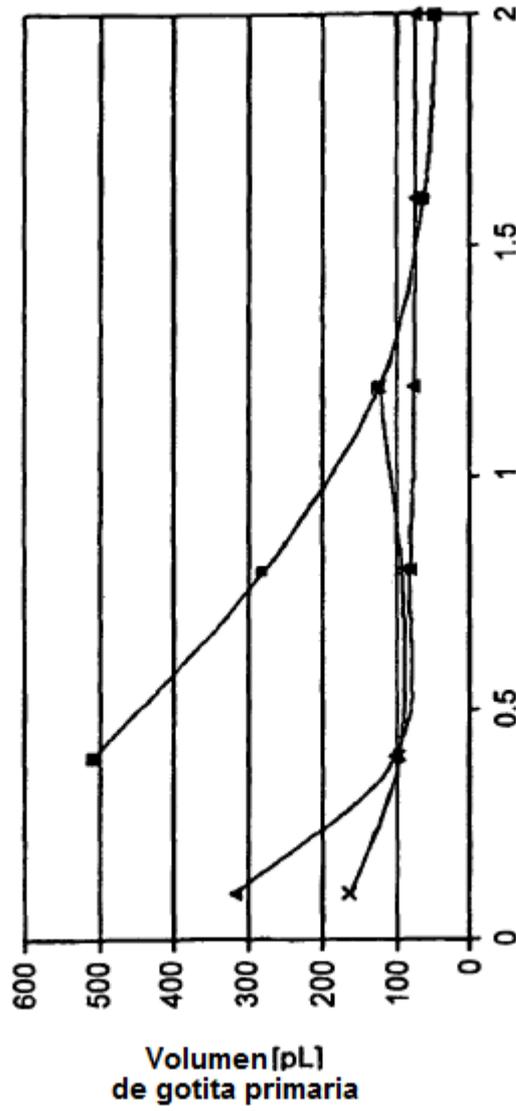


FIG. 7

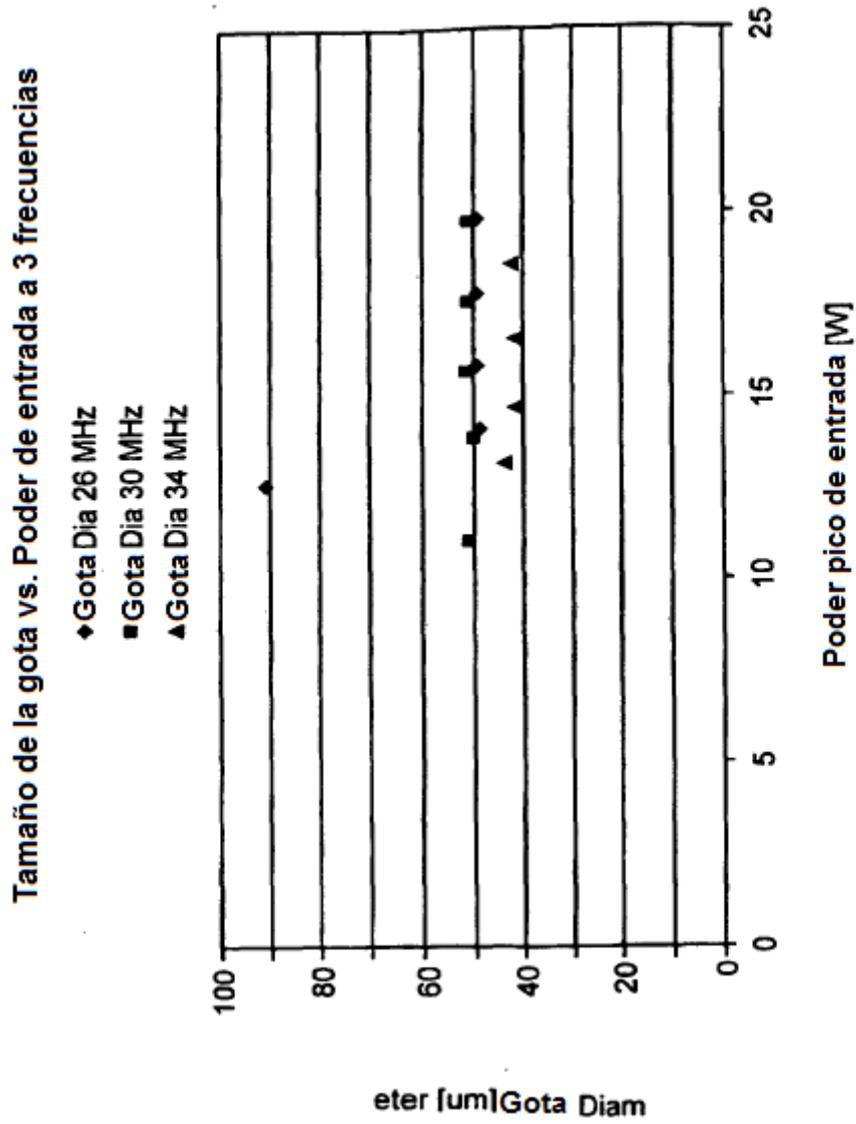
Volumen de gotita vs. Umbral de eyección por encima del poder acústico:  
Lente F3, 30 MHz, H<sub>2</sub>O

- 45 us ráfaga de tono
- ▲— 65 us ráfaga de tono
- x— 105 useg ráfaga de tono

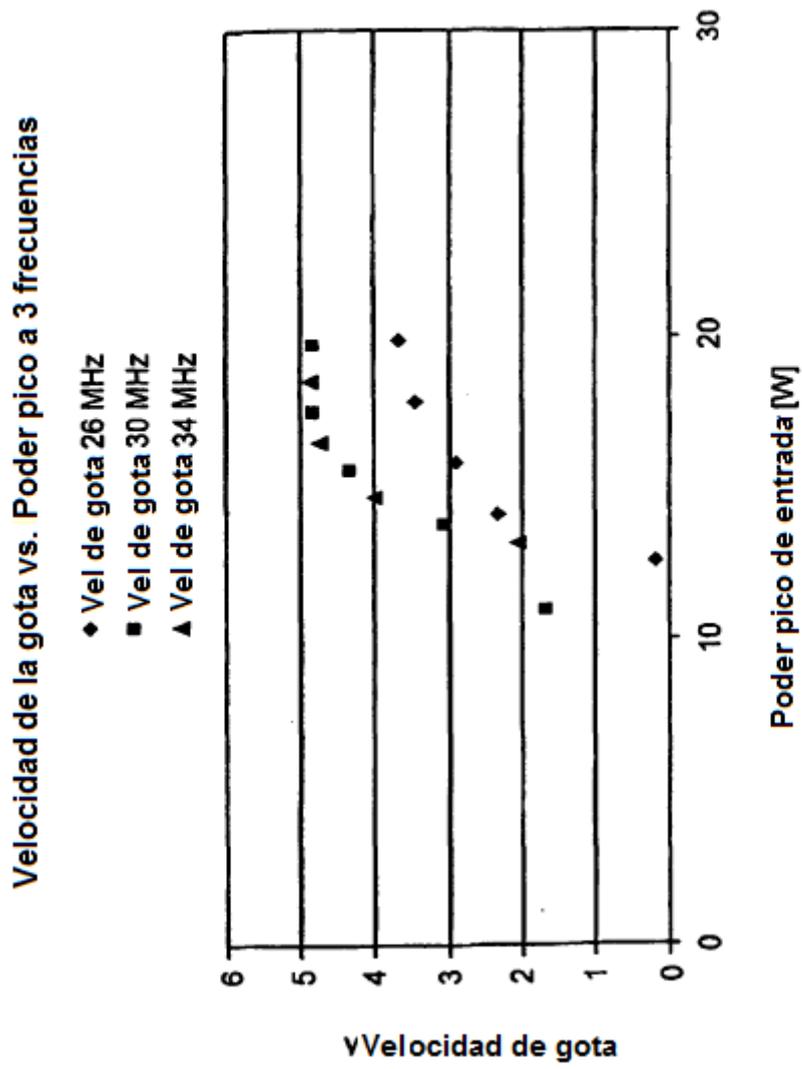


Umbral de eyección por encima del poder [dB]

FIG. 8



**FIG. 9**



**FIG. 10**