

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 244**

51 Int. Cl.:

**B81B 7/00** (2006.01)

**B01D 35/02** (2006.01)

**B01D 61/00** (2006.01)

**B81B 3/00** (2006.01)

**B81B 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2014 PCT/IB2014/060234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14155343**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014 E 14776525 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2978709**

54 Título: **Separador de microfluidos de bomba peristáltica**

30 Prioridad:

**28.03.2013 US 201361806127 P**

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

**09.08.2018**

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA  
(50.0%)**

**1200 Montreal Road**

**Ottawa, Ontario K1A 0R6, CA y**

**THE ROYAL INSTITUTION FOR THE  
ADVANCEMENT OF LEARNING / MCGILL  
UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LI, KEBIN;**

**VERES, TEODOR;**

**DIDAR, TOHID FATANAT y**

**TABRIZIAN, MARYAM**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 678 244 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

Separador de microfluidos de bomba peristáltica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a la separación y filtración de microfluidos, y en particular a una estructura microfluídica de tres capas con una bomba peristáltica, encima de un filtro, que está encima de una salida de filtrado, donde la bomba peristáltica proporciona presiones circulares y verticales para que el fluido evite el bloqueo y mejore la filtración.

Antecedentes de la invención

10 La filtración es una operación importante en dispositivos microfluídicos. Para muchas aplicaciones de laboratorio en fragmentos, se requieren diversas funciones de filtrado, purificación, limpieza, extracción y similares que dependen de la eficiencia. Filtrar aquí equivale a separar sistemáticamente los componentes de una corriente de microfluidos en microfluidos de filtrado y retenido, dependiendo de una propiedad de la especie contenida o arrastrada en la corriente de microfluidos, para producir concentraciones más altas de especies respectivas en los microfluidos de filtrado y retenido que los presentes en la corriente de microfluidos. Para lograr esto, típicamente se proporciona un filtro o membrana  
15 como una barrera selectiva entre un canal para la corriente de microfluidos y el retenido, y el filtrado.

El documento US 6,878,271 enseña la integración de la tecnología de filtro de membrana convencional en sistemas microfluídicos. Se muestra una variedad de sistemas de filtración. En el documento US 6,878,271 se establece (columna 6, línea 35) que una fuente de flujo (no ilustrada) "puede comprender una bomba de jeringa *off-chip*, una bomba peristáltica microfabricada, una jeringa microfabricada, o cualquier fuente de flujo adecuada conocida en la técnica, tal como las descritas en la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. No. 60/391,868".  
20

El principal problema con los filtros/membranas y los separadores similares es que tienen una eficacia limitada. En el tiempo que el fluido pasa en la superficie, solo parte del fluido se separará según lo previsto. Debido a que la porosidad de la mayoría de los filtros disponibles comercialmente está solo en el rango del 20% y debido a que la mayoría de los dispositivos microfluídicos producen el flujo laminar en canales microfluídicos, el 80% de las partículas generalmente se bloquean en la superficie del filtro. El propio filtrado pretendido, en combinación con el producto retenido deseado, tiende a obstruir los poros de los filtros, disminuyendo aún más la eficacia. Aumentar la velocidad de cizallamiento del flujo, y/o la diferencia de presión a través de la membrana puede ayudar a retrasar el efecto de obstrucción (ver la patente de Estados Unidos, 4,871,462) y puede conducir el filtrado deseado a través de perforaciones parcialmente obstruidas, hasta cierto punto, pero aun así no evita el problema de obstrucción. Cuanto mayor es la presión que extrae el filtrado en relación con el producto retenido, más rápidamente se obstruye la membrana, lo que da como resultado un bajo rendimiento después de la obstrucción. Cuanto mayor es la presión que atrae el producto retenido en relación con el filtrado, menos obstruida está la membrana, pero en realidad pasa menos fluido que puede pasar a través del separador, lo que resulta en una menor eficiencia. La solución para obstrucción inherente proporcionada en el documento de Estados Unidos 6,878,271 es 1) para proporcionar un área de superficie de filtración grande, y 2) para reemplazar el módulo con frecuencia, pero esto puede no ser rentable, y a veces puede no ser práctico (por ejemplo, si el filtro está integrado en un sistema microfluídico).  
25  
30  
35

Por lo tanto, se han desarrollado muchas técnicas en la técnica de la filtración; estos pueden clasificarse generalmente en técnicas activas y pasivas<sup>1-3</sup>. Los enfoques de separación activa mejoran la separación utilizando fuerzas físicas de fuentes externas como dielectroforesis<sup>4</sup>, ópticas<sup>5-7</sup>, fuerzas<sup>12</sup> magnéticas<sup>8-11</sup> o acústicas.<sup>12</sup> Sin embargo, muchos de ellos son caros, requieren campos externos y fuentes de alimentación, requieren preprocesamiento de las partículas objetivo, no pueden implementarse fácilmente en múltiples niveles de separación con alta eficiencia y pueden no miniaturizarse fácilmente como se requiere para la aplicación de microfluidos.  
40

Por otro lado, los enfoques de separación pasiva dependen puramente de los fenómenos microfluídicos y la interacción del fluido con las geometrías del residuo microfluídico. Incluye separación inducida por obstáculos, filtración<sup>13-14</sup> hidrodinámica, fraccionamiento<sup>15</sup> del flujo fragmentado, inercia y separación<sup>16-17</sup> del flujo de duna. Los fragmentos, vertederos y vástagos son obstáculos microfluídicos comunes, que están dispuestos en canales microfluídicos para actuar como filtros, disminuyendo las partículas de algunos tamaños y densidades en ciertas áreas, y aumentar la concentración de tales partículas en otras áreas. El filtrado físico es una de las pocas técnicas de separación que no requieren pasos de preprocesamiento o estímulos externos, como campos magnéticos u ópticos. El documento de Estados Unidos 7,727,399 por Leonard et al., es un ejemplo de separación basada en flujo. Cuando tiene un fluido bien caracterizado y el problema de separación está bien circunscrito, existen numerosos medios para mejorar la separación.  
45  
50

Es más difícil proporcionar un sistema de separación de fluidos genérico y multipropósito que opere independientemente de caudales, volúmenes, densidades de filtrado, etc. Al diseñar un separador de propósito general, la mayoría de las técnicas de separación basadas en flujo son de uso limitado, porque cuando el flujo tiene una constitución diferente, la eficiencia del sistema se degrada.  
55

Además del problema de la eficacia operativa, existen problemas en la técnica con la fabricación, ya que la unión de filtros a sustratos en dispositivos microfluídicos puede ser difícil. El sellado y la unión son especialmente problemáticos para membranas delgadas, que de otro modo son muy eficientes y muy adecuadas para aplicaciones de microfluidos. Especialmente si la membrana es frágil, ya que tienden a ser si son de alto rendimiento y tienen poros pequeños. La unión no se puede lograr fácilmente con membranas muy frágiles de una manera<sup>18,19</sup> rentable y eficaz en el tiempo. Esta limitación se vuelve aún más importante (aunque puede que no sea imposible realizarla) cuando se requieren múltiples niveles de membranas para implementar múltiples fracciones de partículas en el mismo dispositivo.

Es conocido en la técnica de filtración macroscópica, recircular fluido desde un flujo retenido hasta el suministro de un filtro en general, sin embargo, el control de flujo y la pérdida de presión a través de la membrana pueden requerir numerosas bombas y equipos de control de flujo para orquestar esta recirculación. El equipo adicional de control de flujo aumenta el costo de los dispositivos microfluídicos. En consecuencia, existe una necesidad de técnicas de separación mejoradas para dispositivos microfluídicos.

#### Resumen de la invención

El solicitante ha diseñado un separador de microfluidos en una estructura microfluídica de tres capas con una capa de bomba peristáltica que tiene fuente y canales de retenidos, un miembro de separación y una capa de salida de filtrado que exhibe una alta eficiencia, que es difícil de lograr en microfluidos donde la turbulencia es difícil de inducir. La fabricación de bajo costo puede proporcionarse mediante el uso de elastómeros termoplásticos blandos (TPE) en alternancia con capas más duras. Por ejemplo, se pueden proporcionar ventajas sustanciales en la unión y sellado del miembro de separación usando TPE como primera y tercera capas.

La capa de bomba peristáltica proporciona al menos tres áreas de control de presión para ejercer fuerzas sobre segmentos de uno o más canales microfluídicos interconectados que se superponen a una primera superficie del miembro separador para permitir que los componentes fluidos de los canales pasen a través del miembro separador. La capa de bomba está adaptada para aplicar presión coordinada en las al menos tres áreas de control de presión para asegurar que el fluido experimente una circulación y a través de las presiones del separador dentro de uno o más canales. La recirculación evita el bloqueo y mejora la eficacia de la separación. El flujo puede hacerse típicamente turbulento, aumentando aún más la eficiencia de la separación.

Por consiguiente se proporciona un separador de microfluidos, comprendiendo el separador una bomba peristáltica acoplada a una fuente y un canal retenido, un miembro de separación de componente fluido, y una salida de filtrado, en donde: la bomba peristáltica comprende al menos tres áreas de control de presión interconectadas por al menos un canal microfluídico o nanofluídico que recubre el miembro de separación, al menos un canal y áreas de control de presión que definen un circuito microfluídico cerrado; y el miembro de separación está situado entre la bomba peristáltica y la salida de filtrado con una primera superficie del miembro de separación acoplada con al menos un canal, y una segunda superficie del miembro de separación acoplada con la salida de filtrado para permitir selectivamente que los componentes fluidos pasen desde al menos un canal a la salida de filtrado.

Las partes del al menos un canal y la salida de filtrado están alineadas preferiblemente en una dirección neta de accionamiento de presión ejercida sobre el área de control de presión.

La bomba peristáltica preferiblemente comprende una capa elastomérica termoplástica que tiene una primera superficie modelada unida al miembro de separación para definir el circuito microfluídico cerrado.

También se divulga un separador de microfluidos integrado que se puede usar para separar/clasificar más de dos partículas de diferentes tamaños. El separador de microfluidos integrado comprende al menos tres capas que definen dos de los miembros separadores de microfluidos. Si bien puede ser posible alinear estos en una pila, es posible organizarlos uno al lado del otro con el filtrado del primer separador de microfluidos que sirve como fuente del siguiente separador de microfluidos.

También en consecuencia, se proporciona un método para separar componentes de un fluido. El método comprende: proporcionar un canal micro o nano-fluídico autointersecante que define un camino cíclico para hacer circular el fluido sobre una superficie receptora de un miembro separador de componente fluido; y aplicar presión coordinada para canalizar en una pluralidad de áreas de control de presión a lo largo de la trayectoria cíclica para hacer circular el fluido sobre la superficie de recepción, aplicando una presión para fomentar una transmisión deseada a través del miembro de separación, y una presión de circulación para eliminar obstrucciones superficiales en el miembro de separación.

El método puede comprender además la aplicación de la presión coordinada durante una duración predefinida, y la inyección continua del fluido en el canal a medida que el filtrado abandona el canal.

Después de inyectar repetidamente el fluido hasta que se agota el fluido, o el retenido contiene demasiado material que no puede pasar a través del miembro de separación, el método puede implicar dispensar un fluido de lavado para eliminar un retenido del canal. La distribución de un fluido de lavado puede comprender accionar una válvula para cerrar un suministro del fluido, o un filtrado del miembro de separación, o para abrir una salida del producto retenido.

Se describirán otras características de la invención o serán evidentes en el transcurso de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

5 Para que la invención pueda entenderse más claramente, las realizaciones de esta se describirán ahora en detalle a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Las figuras 1a, b son ilustraciones esquemáticas de vistas en despiece ordenado y en sección transversal de un separador de microfluidos de tres capas, de acuerdo con una realización de la invención;

La figura 2 es una ilustración esquemática de un separador de microfluidos de 4 capas de prueba con una capa de control neumática, de acuerdo con un ejemplo de la invención;

10 Las figuras 3a, b son imágenes a dos aumentos de un separador de microfluidos de prueba de la figura 2;

Las figuras 4 y 4a son imágenes en una vista superior y una vista en sección transversal de una capa inferior alternativa para el separador de microfluidos de prueba de la figura 2;

La figura 5 es una ilustración esquemática de un proceso para fabricar y ensamblar una realización alternativa adicional de la capa inferior del separador de microfluidos de prueba de la figura 2;

15 La figura 6(A) y (B) son gráficos que muestran los caudales de filtrado y del producto retenido en función de la frecuencia (A) operativa y la presión (B) de aire neumática aplicada para el separador de microfluidos de prueba de la figura 2;

La figura 7 es un panel de gráficos y de imágenes de microscopía de fluorescencia selectiva que muestra la separación de micropelotas utilizando el separador de microfluidos de prueba de la figura 2;

20 La figura 8 es un panel de gráficos y de imágenes de microscopía de fluorescencia selectiva que muestra la separación de micro/nanoperlas utilizando el separador de microfluidos de prueba de la figura 2;

La figura 9 es un panel de imágenes de microscopía de fluorescencia selectiva del separador de microfluidos de prueba de la figura 2, que muestra el lavado eficaz del retenido;

25 La figura 10 es una ilustración esquemática de un separador de microfluidos de 2 etapas de acuerdo con otro ejemplo, teniendo la segunda etapa un separador que filtra componentes de flujo igualmente finos o más finos que el primero; y

La figura 11 es un panel de imágenes y gráficos de microscopía de fluorescencia selectiva que muestra la filtración celular usando el separador de microfluidos de prueba de la figura 2.

Descripción de las formas de realización preferidas

30 La presente invención se refiere a un dispositivo separador de microfluidos con una bomba peristáltica integrada. El separador mejora la eficiencia de separación y disminuye la obstrucción al conducir el fluido a través del separador y hacer circular el fluido alrededor de un canal que pasa sobre el separador. La fuerza de circulación disminuye la obstrucción y aumenta el tiempo de permanencia del fluido fuente adyacente al filtro, y la fuerza de avance estimula la extracción del filtrado. Aquí el filtrado se refiere a la fracción del suministro de fluido que pasa a través del separador, y el retenido se refiere a la fracción del suministro de fluido que no pasa a través del separador, independientemente de la naturaleza del separador.

40 Las figuras 1a, b son ilustraciones esquemáticas de un separador de microfluidos de tres capas en vistas en sección transversal despiezadas y ensambladas, respectivamente. El separador de microfluidos incluye una capa 10 de bomba peristáltica, preferiblemente formada por un elastómero termoplástico (TPE) u otro material que comunica una fuerza, teniendo una primera superficie 10a de reunión que está diseñada para definir un canal 12 en una interfaz 14 entre la capa 10 de bomba peristáltica y el miembro 15 separador. La unión íntima de la capa 10 de bomba peristáltica y el miembro 15 separador es típicamente relativamente fácil si se eligen materiales adecuados. Similar a la capa 10 superior, se proporciona una capa 16 de filtrado que tiene una primera superficie 16a de reunión modelada para producir un espacio para, o conducto para filtrado, unido al miembro 15 separador en un lado opuesto del miembro 15 separador.

45 El miembro 15 separador se ilustra esquemáticamente como un filtro, y se define preferiblemente en un material relativamente rígido. Se apreciará que el miembro 15 separador puede ser un filtro de superficie, un filtro de profundidad, un filtro electro osmótico, un gel de electroforesis, una membrana, una membrana de ósmosis o ósmosis inversa, o una membrana químicamente activada, una membrana semipermeable, una membrana selectivamente permeable, una membrana biológica, una membrana sintética, una membrana pasiva, una membrana activa, una

5 membrana actuable, tales como una membrana actuable accionada eléctricamente, una membrana cargada, una membrana polarizada, una membrana neutra, una membrana porosa, una membrana de gradiente, una membrana orgánica, una membrana inorgánica, una membrana líquida, una membrana de gel, una membrana semisólida, una membrana sólida, una malla, una membrana sólida porosa, una membrana de emulsión, una membrana reactiva y una membrana foto reactiva. A continuación, hemos demostrado la invención con membranas porosas de plástico sólido, sin embargo, dado el flujo turbulento generado, se espera que la gama completa de los separadores de fluido conocidos en la técnica se pueda unir útilmente a la bomba peristáltica de la presente invención para lograr una mejor filtración y una obstrucción o bloqueo reducidos.

10 Los patrones de las superficies 10a y 16a están alineados, y definen una porción 13 usada del miembro 15 separador, como el área total sobre la cual el fluido en el canal 12 puede pasar a la capa 16 de filtrado.

15 El canal 12 está en comunicación de fluido con una fuente 18, y además puede acoplarse a un sumidero 19 de retenido. El canal 12 es una parte de un circuito microfluido cerrado (es decir, una trayectoria de auto intersección). Se prefiere un circuito cerrado porque permite una filtración continua para cualquier duración deseada, sin ningún equipo adicional de control de microfluidos (válvulas, microbombas, etc.) para extraer y reinsertar el fluido. Se prefiere, pero no es necesario, que todo el circuito cerrado se superponga a la porción 13 utilizada, como se muestra. De esta forma, la recirculación se proporciona continuamente sin retirar el fluido del contacto con el miembro 15 separador. Se apreciará que los puntos de control de recirculación y/o presión 20 pueden proporcionarse alternativamente en puntos en los que el fluido no está en contacto con el miembro 15 separador (por ejemplo, al lado de la porción 13 usada). Por ejemplo, puede ser preferible colocar los puntos 20 de control de presión lejos del miembro 15 separador si el miembro 15 separador está compuesto de una membrana que no puede soportar una presión deseada aplicada directamente a los puntos 20 de control de presión.

20 Aunque la realización ilustrada se muestra con una pista sustancialmente circular que tiene tres áreas 20 de control de presión ampliadas, se apreciará que una gran variedad de diseños para un circuito cerrado es igualmente posible. En lugar de mostrar un anillo simple, puede ser eficiente tener múltiples anillos en diferentes radios que se comuniquen entre las áreas de control de presión, o tener múltiples bucles que no sean concéntricos, como en la figura 8 o rosa topológica de cualquier número, o más generalmente un conjunto de bucles que tienen cierto número de conexiones.

25 Aunque se muestran tres regiones 20 de control de la presión que no se superponen, puede haber más, o pueden estar ordenadas de forma diferente. En algunas realizaciones, las regiones 20 de control de presión pueden superponerse y asemejarse efectivamente a un único área 20 de control de presión, pero el funcionamiento del dispositivo tendrá presión en una o más partes separadas de las áreas ampliadas a la vez, y la coordinación de la presión aplicada en las partes separadas equivale a áreas 20 de control de presión separadas para la presente invención, incluso si la presión se aplica a cada parte del canal en un punto del ciclo u otro.

30 Una superficie superior (o superficie intermedia) de la capa de bomba 10 peristáltica proporciona una región 21 alineada con cada región 20 de control de presión, donde la presión se comunica al canal 12. La presión puede suministrarse como actuación positiva o negativa, porque el fluido puede circular por liberaciones cíclicas a presión a lo largo del canal, o por presión positiva aplicada, en secuencia. Por ejemplo, una presión de vacío aplicada en la región 21 (suponiendo que esté cerrada) puede levantar una membrana que expande un volumen de la región 20 de control de presión para efectuar el bombeo, o puede usarse un aumento de presión en la región 21 para accionar la región 20 de control de presión. La región 21 puede accionarse con presión neumática o hidráulica; también pueden ser actuables electromecánicamente, por ejemplo, con polímeros piezoeléctricos, conocidos o electroactivos; o puede ser actuable por la variedad completa de dispositivos mecánicos adecuados conocidos en la técnica.

35 No es necesario que exista una relación de uno a uno entre las bombas para controlar las regiones 21 y las regiones 20 de control de presión. Por ejemplo, algunos diseños pueden tener una pluralidad de regiones 20 de control de presión comúnmente accionadas por un conjunto de regiones 21 que están acopladas para operación concurrente, o para operar con un retardo de tiempo inherente que es beneficioso para la operación de bombeo dentro del canal 12.

40 Hay un valor para maximizar el área 13 de superficie usada, ya que esto afecta la eficiencia de la separación. Como se muestra mejor en la figura 1b, en la realización ilustrada, la porción 13 usada se maximiza reduciendo de manera efectiva el canal 12, de modo que el canal 12 tiene una sección transversal que disminuye con una mayor distancia desde la interfaz 14 mientras proporciona el mayor volumen del fluido dentro de las áreas de control de presión (donde la altura del canal es mayor, y hay menos ahusamiento).

45 Las estructuras planas de una amplia variedad de materiales se modelan fácilmente. El separador como se muestra se puede formar con un diseño de tres capas. Puede proporcionarse una cuarta capa para encerrar las regiones de presión para permitir el control de fluido presurizado sobre las regiones de presión, y para controlar de ese modo independientemente las presiones en las áreas de control de presión correspondientes.

50 En uso, el fluido que se va a separar se suministra a través del puerto 18, y llena el canal 12. Esto se puede lograr preparando primero el separador con un fluido de cebado, y luego suministrando el fluido que se va a separar. El fluido de cebado puede eliminarse a través del puerto 19 opcional retenido, y/o la salida opcional en la capa 16 retenida, por

ejemplo. Las áreas de control de presión son accionadas y relajadas secuencialmente para bombear fluido alrededor del circuito microfluídico cerrado.

Ejemplos

5 Un ejemplo de un separador de microfluidos se ilustra esquemáticamente en la figura 2, que es un mosaico que muestra una vista a ensamblada, transparente a del separador de microfluidos, una vista en sección transversal b de un canal de microfluído dentro del separador, y una vista en despiece c del separador de microfluidos Este separador se diseñó para la separación de partículas/células de un tampón o suspensión acuosa. Este dispositivo se fabricó en cuatro capas: una capa de canal microfluídico inferior (BFL), una capa de membrana porosa (ML) formada de policarbonato (PC), una capa superior de microfluidos (TFL) y una capa de control neumático de aire (PL). El BFL, TFL y PL se formaron cada uno de un elastómero termoplástico (TPE), específicamente Mediprene de 400M. El ML elegido para este ejemplo es un filtro de policarbonato disponible comercialmente (EMD Millipore, MA, EE. UU.) Con un espesor en el rango de 7  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$  y con tamaños de poro de unos pocos cientos de nanómetros a 10  $\mu\text{m}$ . Para evitar el colapso del filtro, se añadieron algunos pilares de soporte dentro del canal de microfluidos en la capa de microfluidos inferior.

15 Con este diseño, un grosor del BFL fue de 1 mm (y de acuerdo con el mismo diseño es preferiblemente de 1 a 3 mm), el TFL es de 300+/-10  $\mu\text{m}$  (y de acuerdo con el mismo diseño preferiblemente de 0.2 a 0.3 mm), y el PL fue de 1 mm (y de acuerdo con el mismo diseño es preferiblemente de 1 a 3 mm). La profundidad del canal del TFL se controló para asegurarse de que el espesor del residuo TPE (después del modelado) estaba en un rango que las micro válvulas peristálticas integradas y microbombas se pueden operar a baja presión neumática (menor a 15 psi) y al mismo tiempo para lograr cierta velocidad de bombeo (mayor a 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Esto se logró controlando el espesor inicial de la lámina de la película TPE y el grosor de las características del molde blando. La capa residual del TPE del TFL se controló para que fuera de 100+/-5  $\mu\text{m}$  (y según el mismo diseño puede ser de 50-150  $\mu\text{m}$ ). Esta capa de residuos se usa para controlar la presión en las áreas de control de presión durante el funcionamiento de la micro bomba peristáltica. La actuación puede generar un flujo turbulento dentro del área del canal circular del dispositivo, y generalmente evita o limita la obstrucción del filtro.

25 Se aplicó patrón para formar el BFL, TFL y PL rápidamente mediante gofrado en caliente con moldes blandos (SU-8) (para detalles, véanse los documentos WO 2012/109724 del solicitante y US 12/588,236, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia). Un patrón aplicado al BFL consiste en un canal circular acoplado a un canal recto a una salida. Un patrón aplicado al TFL tiene el patrón aplicado al BFL con un canal de ingreso adicional, que se divide por una unión para permitir que dos entradas diferentes accedan al canal circular. El canal circular es el ejemplo más simple de un circuito microfluídico cerrado. El canal recto y la salida del TFL proporcionan una corriente de captura del retenido, aunque en realizaciones alternativas, esto puede no ser deseado o no requerido. Con este diseño, el intercambio de componentes líquidos entre los canales microfluídicos superiores e inferiores solo puede ocurrir en el área del canal circular. La capa neumática de control de aire está alineada con la capa superior de microfluidos, y no hay diferenciación entre las áreas de canal y de control de presión del canal circular, sino para la alineación con las regiones de presión del PL.

35 Cada región de presión tiene forma de abanico (que define un sector anular) y tiene un canal microfluídico y un puerto respectivo que se extienden por vías hacia la parte superior del PL. Vías que acoplan las dos entradas y la salida del retenido del TFL con una parte superior del PL, y la salida de filtrado del BFL con el PL se proporcionan después del montaje. Se suministra (3) una pluralidad de válvulas adicionales tanto en las corrientes de entrada como en las del retenido del TFL, mediante cámaras correspondientes, y conectando canales de microfluidos en el PL.

45 El proceso de ensamblaje del dispositivo microfluídico integrado es bastante sencillo. Una vez que se diseñó el BFL, se coloca ML (membrana porosa de policarbonato) sobre la capa de TPE para cubrir el área del canal circular. Luego, el TFL modelado se alinea en la parte superior de la capa BFL bajo un microscopio óptico para asegurarse de que el canal circular en la capa superior esté bien alineado con su contraparte en la capa inferior. Esto es seguido colocando el lado del patrón PL hacia abajo, sobre el TFL bajo un microscopio óptico para asegurarse de que las cámaras de aire estén bien alineadas con el canal circular de la capa superior de microfluidos. Finalmente, una cubierta termoplástica dura (Zeonor 1060R) con puertos de conexión se une a la parte superior del dispositivo ensamblado. El PL está modelado y se coloca en la parte superior del TFL.

50 La figura 3a, b son fotografías de este ejemplo. La figura 3a muestra la mayoría del separador de microfluidos de una superficie superior. Las flechas de abajo muestran las dos entradas simétricas para separar el fluido; las flechas de la izquierda son dos de los puertos neumáticos de las regiones de presión adyacentes, la flecha desde la parte superior es la vía al TFL para el flujo del retenido, y la flecha de la derecha es una vía al BFL para el flujo del filtrado. La figura 3b es una ampliación que presenta el circuito microfluídico cerrado. Las tres flechas de la figura 3b apuntan al canal de filtrado (cerca de las 3 en punto) que tiene pilares en el canal para soporte; un canal para la región de presión en forma de abanico (cerca de las 8 en punto) y esa región de presión en forma de abanico (cerca de las 10 en punto). A partir de esta imagen, se puede ver un contorno del filtro circular, así como los canales circulares más blancos y los canales de conexión. Dos de las tres válvulas en la fuente y los canales retenidos también son visibles en la parte inferior y superior. Se observará que una de las regiones de control de presión y su área de presión se superponen al suministro de entrada (1), una segunda región de control de presión y su área (2) de presión no se superpone a ningún

acoplamiento con el canal circular, una tercera región de control de presión y área de presión se superpone al canal (3) retenido y una cuarta cubre el filtrado (4).

Como se mencionó anteriormente, los pilares de soporte se fabricaron en el medio del BFL para evitar el colapso del ML en el canal inferior, y también se incluyeron en el canal de filtrado. Los pilares tenían 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un espacio de 1 mm.

Se apreciará que en algunas realizaciones es deseable proporcionar un área superficial alta o un gran volumen para el filtrado. Por ejemplo, el separador puede estar involucrado en un proceso que tiene un paso de incubación posterior a la filtración. Si es así, puede ser conveniente proporcionar una cámara ampliada para que el filtrado se congregue. Para evitar el colapso de la ML, se podrían emplear varias estrategias, incluida la provisión de un refuerzo plano local directamente debajo de las áreas de control de presión. En algunos casos, una caída de presión de fluido a través del ML podría provocar un colapso o una distorsión no deseada del ML. En tales casos, se puede proporcionar una serie de pilares, postes, crestas u otros soportes.

Las figuras 4 y 4A ilustran esquemáticamente una realización alternativa del BFL. La figura 4 es una vista del BFL que lleva un patrón diferente, pero utilizable en combinación con ML, TFL y PL de las figuras 2,3. La figura 4a es una imagen de sección transversal a lo largo de A. El patrón aplicado a BFL implica evacuar sustancialmente un disco con una cavidad de pared circular, y soportar la cavidad con una matriz de pilares. En la realización ilustrada, se proporciona un rebaje para el ML, que puede ser deseable si el grosor del ML es lo suficientemente alto como para que surjan preocupaciones sobre el sellado alrededor del borde. El solicitante ha descubierto que las membranas que tienen espesores de aproximadamente 7-20  $\mu\text{m}$  pueden no requerir dicho rebaje. Se observa que un receso similar podría proporcionarse alternativamente en un TFL, y tales pilares o similares, pueden ser deseables en los conductos del TFL. Se entenderá que, dependiendo del grosor del ML, puede no ser necesario dicho receso, ya que se puede proporcionar un sello mediante un enlace entre el BFL y el TFL, y cualquiera (o ambos) del BFL o TFL y una periferia del ML. Ventajosamente, la cámara circular puede ser ligeramente más grande que el diámetro exterior del canal circular en el TFL, pero más pequeño que el diámetro del ML, de modo que el área de filtrado efectiva no está limitada por el BFL, y hay menos restricciones en la alineación entre el TFL y BFL durante el ensamblaje del dispositivo.

La figura 5 ilustra esquemáticamente 5 etapas para producir un BFL de acuerdo con otra realización más, que coopera igualmente con la realización de las figuras 2,3. El BFL se puede proporcionar preferiblemente en un plástico más duro, o vidrio (Zeonor 1060R, por ejemplo, que se une fácilmente y de forma segura a TPE), y puede producirse en masa de forma económica mediante moldeo por inyección. Por razones similares, el PL puede estar compuesto por el mismo material que el BFL. El BFL puede tener una superficie funcionalizada de área de superficie alta, tal como la proporcionada por el conjunto de pilares, por ejemplo.

Si el material del BFL no se sella fácilmente contra el ML, se puede proporcionar una junta de TPE (paso A). La junta puede tener una variedad de formas, tamaños y contornos, en dependencia de la disposición del BFL, pero en la realización ilustrada, una abertura de la junta TPE anular está alineada con un canal en la capa BFL para que el líquido, después de pasar a través del filtro PC a la cámara circular, fluya a la salida inferior en el BFL. El BFL se puede formar con el ML en mente (paso B) y proporcionar pilares para apoyar el ML. La junta se inserta en el BFL, para sellar contra un piso del BFL, como se muestra en el paso C. Luego, en el paso D, se inserta el ML y se sella contra la junta. Suponiendo que el TFL proporciona inherentemente un material para unir y sellar al ML y al BFL, la colocación alineada del TFL será suficiente para encerrar los canales y áreas selladas.

El rendimiento de las características de flujo del separador de la figura 3 ha sido estudiado. El separador de microfluidos mostrado en la figura 3 se ensambló y los puertos del dispositivo microfluidico se acoplaron a un colector de control neumático de 12 canales hecho en casa. Consiste en 24 válvulas electromagnéticas. Las operaciones de apertura y cierre están controladas por el software Lab View. La presión de salida máxima del colector es de 30 psi. La figura 6(A) es un gráfico de la velocidad de bombeo del dispositivo en función de la frecuencia operativa a una presión de aire neumática de 9 psi aplicada cuando el filtrado está cerrado y el retenido está abierto (círculos rellenos) o cuando el producto retenido está cerrado y el filtrado está abierto (círculos sólidos). En general, la velocidad de bombeo (caudal) aumenta al aumentar la frecuencia operativa de menos de 1 Hz a casi 9 Hz. Se observaron caudales tan altos como 40  $\mu\text{l}/\text{min}$  a través del ML. El ciclo utilizado se describe a continuación como operación como dos bombas síncronas de desplazamiento positivo.

La figura 6(B) muestra la tasa de bombeo del dispositivo como una función de la presión de aire neumática aplicada a una frecuencia operativa fija de 3 Hz para los mismos dos casos con las mismas etiquetas que en la figura 6(A). La velocidad de bombeo (caudal) aumenta al aumentar la presión aplicada cuando se fija la frecuencia operacional. El dispositivo puede operar a un caudal bastante alto con una presión aplicada relativamente pequeña.

Al equilibrar las resistencias de flujo del retenido y las corrientes de filtrado, se pueden lograr altas velocidades de caudal alrededor del circuito microfluidico cerrado mientras se promueve la filtración de alta eficiencia. Estos caudales permiten flujos turbulentos, al menos dentro del circuito cerrado, lo que es conducente a la eliminación del bloqueo en la superficie del ML, disminuyendo la probabilidad de bloqueo e incrementando el rendimiento de los componentes del filtrado de la corriente incluso en el caso de un bloqueo parcial.

La microbomba peristáltica (por ejemplo, para bombear fluido desde la fuente al retenido, como se muestra en la figura 3b) se puede operar mediante la activación de cuatro superficies de control de presión dispuestas en cuatro puntos cardinales en el canal circular tratando dos ramas del circuito cerrado como dos bombas de desplazamiento positivo sincrónicas, es decir, con un ciclo que comprende: Paso 1) Se inyecta aire dentro de las cuatro regiones de presión a una presión operativa, haciendo que las cavidades cerradas dentro de las regiones de presión se hinchen, reduciendo un volumen dentro de las cuatro áreas de control de presión correspondientes. Paso 2) 3 etapas de liberación del área de control de presión 1, seguidas de las áreas de control de presión 2 y 4, y finalmente se libera el área de control de presión 3, extrayendo el líquido en etapas desde la entrada hacia el área de control de presión 3. Paso 3) es una presurización en tres etapas del fluido embebido, que se presuriza por etapas y se expulsa. El área de control de presión 1 se presuriza primero mientras que las áreas de control de presión 2, 3 y 4 se mantienen en el estado de ventilación. Esto empuja una fracción del volumen sistólico del líquido de regreso a la entrada y el resto del volumen sistólico se fuerza hacia el producto retenido. Si la resistencia del flujo de fluido a través de la membrana es menor que la resistencia hacia la entrada, la fracción más pequeña se extraerá retrógrada hacia la entrada. Una vez que el área de control de presión 1 está presurizada, hay una reducción sustancial en cualquier flujo retrógrado adicional durante el ciclo. Con el área de control de presión 1 mantenida bajo presión, las áreas de control de presión 2 y 4 se presurizan simultáneamente, seguido por la presurización del área de control de presión 3 una vez que las áreas de control de presión 2 y 4 están presurizadas completa o sustancialmente. Por lo tanto, el ciclo ha regresado al paso 1. Esto forma dos bombas de desplazamiento positivo paralelas y sincrónicas. Este ciclo puede preferirse con el flujo retenido cerrado, o sustancialmente cerrada, en la que una gran parte del flujo se fuerza a través de la membrana, como una etapa de purificación en la que se espera una pequeña cantidad de impurezas.

Una ventaja significativa de este esquema de control es que no se requiere control de flujo más que la bomba peristáltica. El funcionamiento de la bomba es suficiente para absorber el fluido y conducirlo a través del retenido y las corrientes de filtrado. Sin embargo, se puede proporcionar una operación mejorada impidiendo el flujo retrógrado, o suprimiendo el retenido y/o los flujos de filtrado durante los pasos 2 con válvulas adicionales o medios de control de flujo, si están bien sincronizados y receptivos, por ejemplo, con actuación precisa de las válvulas mostradas en las figuras 2, 3.

Hay varias operaciones de bombeo, que se pueden usar para diferentes propósitos de separación/clasificación de partículas, que un mejor uso de las áreas de control de presión para impulsar selectivamente las corrientes de filtrado y retenido. Por ejemplo, la válvula entre el canal circular superior y el producto retenido puede cerrarse durante la primera parte de un ciclo. Por ejemplo, los pasos 1 y 2 descritos anteriormente pueden realizarse para embeber el fluido durante una primera fase de la primera parte, y el fluido puede retenerse dentro del canal circular para una segunda fase de la primera parte. Después de la segunda fase, la válvula de retenido se abre, para eliminar el retenido, y se completa la etapa 3 para eliminar el retenido, preparar el separador para el cierre de la válvula de retenido y el paso 1.

Durante la segunda fase, se puede observar una variedad de procesos para conducir selectivamente una corriente de filtrado. Un primer ejemplo: presurizar el área de control de presión 1, y luego el área de control de presión 3 dará como resultado cierta pérdida de fluido como flujo retrógrado, y una presurización del fluido entre la válvula de retenido y el área de control de presión 3, pero mientras la resistencia del fluido a través del ML sea menor que estos, la mayor parte del fluido quedará atrapada en el canal circular y se expresará a través del ML. La subsiguiente presurización de las áreas 2 y 4 de control de la presión de presurización con la presión retenida en las áreas 1, y 3 de control de la presión conducirá adicionalmente el fluido a través del ML de manera eficiente. Dicha progresión impulsará selectivamente una corriente de filtrado.

Un segundo proceso de segunda fase, que se puede usar ventajosamente en alternancia con el primer ejemplo, implica hacer circular selectivamente el flujo en el canal circular. Esto se puede realizar haciendo circular la presión a las áreas de control de presión en secuencia. Esto puede implicar mantener sustancialmente relajadas una, dos o tres áreas de control de presión a la vez. Si dos están abiertos a la vez, pueden ser áreas de control de presión vecinas u opuestas, lo que conduce efectivamente a una o dos ondas por iteración. Cada vez que el área de control de presión 1 se relaja, se aspira más fluido y las corrientes de filtrado pueden fluir libremente durante este proceso, pero se obtiene un equilibrio de presión durante todo este proceso si el número de áreas de control de presión relajadas permanece fijo, y el flujo del filtrado se equilibrará con el fluido extraído para lograr un enjuague eficaz del ML. En algunas aplicaciones, se puede proporcionar una válvula de control de flujo en la corriente de filtrado, que se puede operar para evitar el flujo de filtrado nominal durante una presión cíclica, por ejemplo, si el líquido es una descarga y el proceso se está realizando para mejorar la recuperación del retenido.

Como una variante del proceso de la segunda fase, se puede acumular (o disminuir) una presión dentro del canal circular al disminuir gradualmente (o aumentar) un número de áreas de control de presión relajadas en cualquier instante dado.

Por lo tanto, es posible, con esquemas de control de presión adecuados, proporcionar una gama de procesos que tendrán diversos equilibrios de presiones de fluido entre las corrientes de producto retenido y de filtrado, como se desee en diferentes procesos o con diferentes operaciones durante la clasificación, separación o limpieza, cebado y bombeo. El proceso puede ser elegido, probado o mejorado, empíricamente, semi-empíricamente, o mediante un modelo

microfluídico. Se pueden incorporar sensores y retroalimentación en un controlador para controlar el accionamiento en las regiones de presión.

5 Aunque el ejemplo anterior consideraba que los dos canales al canal circular eran una entrada de fuente y un flujo retenido, se aprecia que, en otras realizaciones, se puede filtrar una corriente mixta utilizando este separador. Ambas corrientes pueden ser introducidas por canales respectivos, y mezcladas en el canal circular. Un ejemplo de un proceso para mezclar y filtrar sería comenzar con todas las áreas de control de presión presurizadas, relajando las áreas de control de presión 1 y 3 para empapar algunos de los dos fluidos, relajar las áreas de control de presión 2 y 4 para extraer los fluidos embebidos en el canal circular, en cuyo punto los fluidos pueden someterse a una serie de procesos que, respectivamente, circulan y expresan la mezcla en varios grados, seguido de presurizar las áreas de control de presión 1 y 4, y luego presurizar las áreas de control de presión 2 y 3 para expresar la mezcla, y devolver el aparato al estado inicial.

15 Se observará que las únicas aplicaciones que requieren la capacidad de actuación independiente de las cuatro áreas de control de presión es la progresión de la segunda fase (y su variante). Por lo tanto, para algunas aplicaciones de la invención, cuando se proporciona una circulación suficiente para evitar la obstrucción sin requerir tal proceso, las regiones de presión 2 y 3 se pueden aplicar comúnmente mediante un único actuador de fuerza. De forma similar, en la operación de filtrado de mezclado, las regiones de presión 1 y 4 pueden aplicarse comúnmente mediante un único actuador de fuerza, lo que puede simplificar considerablemente los sistemas de control.

20 Dado que el dispositivo posee funciones de mezcla y separación, una aplicación directa (además de la separación de células) de este tipo de dispositivo está en el uso de la captura y liberación del objetivo de ADN. Por ejemplo, una corriente de perlas recubiertas con adsorbente de afinidad de ADN y una corriente de solución de ADN diana se introducen simultáneamente en el canal circular. Al accionar la microbomba peristáltica integrada en el modo de mezcla, el ADN objetivo podría unirse eficazmente a las perlas que se capturarán en la superficie del filtro. La unión de ADN en las perlas podría maximizarse haciendo circular la corriente de ADN diana desde el flujo de filtrado de regreso al ingreso y luego mezclándose una y otra vez con las perlas capturadas en el filtro. Esos ADN de unión no específicos en las perlas podrían lavarse haciendo circular tampón de lavado en el canal circular. El ADN unido específico en las perlas se puede liberar bombeando el tampón de elución específico dentro del canal circular y mezclándolo con las perlas capturadas accionando los modos de mezcla y bombeo y finalmente recogiendo del canal de filtrado para un análisis posterior.

30 La operación del separador de microfluidos ha sido demostrada. La figura 7 es un mosaico de resultados de esta demostración. La demostración usó el separador mostrado en la figura 3, usando los materiales y métodos descritos anteriormente, excepto que el tamaño de poro del filtro utilizado en el dispositivo es de 10  $\mu\text{m}$ . El sistema de control utilizado fue el mismo que el descrito anteriormente. En este experimento, se preparó una suspensión de micropérlas de poliestireno de fluorescencia azul de  $\mu\text{m}$  y verde de 2  $\mu\text{m}$  en agua desionizada con una concentración de  $5 \times 10^4$  p/ml cada una. Luego se prepararon suspensiones mixtas con volúmenes iguales de cada suspensión. Las muestras iniciales y recogidas en cada salida se analizaron con un microscopio de fluorescencia invertida (Nikon TE-2000-E). Las microesferas recogidas se analizaron adicionalmente usando un sistema de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las partículas de tamaño nano separadas también se evaluaron usando un Multi-Angle Particles Sizer (Brookhaven Instruments Corporation).

40 La separación del cordón se realizó aplicando dos modos de bombeo diferentes, y se investigó la eficiencia de cada uno. El primer modo de bombeo funcionó de la siguiente manera: las válvulas adicionales a los flujos retenidos se cerraron y la mezcla de micropérlas se introdujo desde la corriente de entrada, luego se pasó a través de la membrana a la salida inferior. Esta etapa de filtración fue seguida por el lavado de la membrana usando el mismo modo de bombeo (donde la corriente de entrada suministraba líquido exento de gotas) para eliminar las pequeñas perlas restantes. Al final, las válvulas adicionales para el flujo retenido se abrieron y las perlas más grandes salieron de la salida superior. 45 Para el segundo modo de bombeo (figura 3(b)), tanto el retenido como las corrientes de entrada se usaron como entradas. La mezcla de perlas entró a través de la corriente de entrada, y se introdujo un líquido exento de perlas a partir del flujo retenido. Después de filtrar la mezcla, se realizó una etapa de lavado usando el mismo modo de bombeo para eliminar cualquier perla pequeña, cerrando las válvulas adicionales de la corriente de entrada. Finalmente, invirtiendo la presión sobre el flujo retenido, el flujo se dirigió hacia la salida superior y se recogieron perlas más grandes en esta salida. 50

Una banda derecha de imágenes son imágenes de microscopía de fluorescencia selectiva etiquetadas de a a e. La imagen a de microscopía de fluorescencia selectiva es representativa de la mezcla inicial, que tiene partes sustancialmente iguales de micropérlas (de 2  $\mu\text{m}$ ) y (15  $\mu\text{m}$ ). Las imágenes etiquetadas b y c, y d y e representan respectivamente las corrientes de salida superior (retenido) y de salida inferior (filtrado) para el primer modo y el segundo modo de bombeo (esquema de control). Se observa que sustancialmente no se encuentran micropérlas fluorescentes verdes en ninguna corriente de filtrado, y que el flujo retenido del primer modo (b) muestra aproximadamente 2 de 10 perlas fluorescentes azules, y ninguna fluorescencia azul en la imagen d. 55

Los gráficos f y g son gráficos de imágenes de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la distribución de tamaños de la mezcla inicial. Los gráficos h e i son imágenes de FACS para una distribución de tamaños 60

de muestras recogidas en la salida superior (retenido) aplicando el segundo modo de bombeo. Los gráficos j y k son las imágenes FACS para la distribución del tamaño de la muestra recogida en la salida inferior (filtrado) aplicando el segundo modo de bombeo. Los gráficos de barras l y m muestran la concentración inicial de perlas mezcladas y la concentración de perlas recolectadas en los canales de salida superior e inferior aplicando los modos de bombeo primero (l) y segundo (m), respectivamente.

La eficiencia de separación se definió como la relación entre el número de partículas objetivo y el número total de partículas recogidas en cada salida.<sup>18</sup> Se demostró que el segundo modo era sustancialmente perfecto.

El separador también se probó para la separación del cordón de tamaño submicrométrico. En este experimento, se preparó una suspensión de partículas de 390 nm en agua desionizada con una concentración de  $4,5 \times 10^5$  p/ml. Luego se mezcló con una suspensión de microperlas de 2  $\mu\text{m}$  preparada a una concentración de  $1,5 \times 10^4$  p/ml con volúmenes iguales de cada suspensión. La figura 8 tiene paneles etiquetados a-d. Los paneles a-c son imágenes de microscopía de fluorescencia selectiva de una mezcla inicial, salida inferior (filtrado) y salida superior (retenido). El panel d muestra un gráfico de barras que muestra menos de aproximadamente 5% de contaminación cruzada en el producto retenido. En principio, el dispositivo inventado se puede aplicar para separación/clasificación de nanopartículas incluso más pequeñas ya que los filtros de PC con tamaño de poro por debajo de 100 nm están disponibles comercialmente. También se puede usar una amplia variedad de otros filtros, activos y pasivos, y aprovechar el flujo turbulento y las flexibilidades del separador de microfluidos de bomba peristáltica de la presente invención.

La figura 9 muestra el área de superficie ML en el canal circular en diferentes etapas del proceso de separación para la separación de partículas de 2  $\mu\text{m}$ -15  $\mu\text{m}$  y 2  $\mu\text{m}$ -390 nm. La figura 9A es una imagen de fluorescencia de la superficie de la membrana después de la separación de microperlas de 2  $\mu\text{m}$  de microperlas de 15  $\mu\text{m}$ , usando solo la primera estrategia de bombeo (flujo retenido cerrado) usando el chip de tamaño de poro de 10  $\mu\text{m}$ . Perlas de 15  $\mu\text{m}$  permanecen en la superficie de la membrana. La misma área superficial se muestra en la figura 9B después de la etapa de lavado con la corriente de filtrado cerrada, y el bombeo de líquido sin perlas. Muy pocas perlas permanecieron en la superficie de la membrana. Las figuras 9C y 9D también son imágenes de fluorescencia, pero desde la superficie de la membrana de 800 nm en el canal circular (lado TFL), después de recoger partículas de 390 nm, y después de una etapa de lavado, respectivamente. Casi todas las cuentas de 2  $\mu\text{m}$  unidas a la superficie de la membrana en esta área se despegaron y se recogieron. Estos resultados indican el efecto de un flujo turbulento para separar y recoger perlas de la superficie de la membrana. Por lo tanto, el dispositivo fabricado se puede usar repetidamente sin necesidad de una limpieza adicional del área de la membrana.

La figura 10 ilustra esquemáticamente un ejemplo de dos separadores de microfluidos de bomba peristáltica en un solo dispositivo, con el flujo de filtrado del primero que proporciona una fuente para el segundo. Una vía se usa para interconectar estas dos capas en serie. Un primer retenido, que es el retenido del primer separador de microfluidos, tendrá los componentes fluidos que no pasaron la primera membrana, que es un tipo diferente de membrana, o una membrana de porosidad más fina que la primera membrana. El retenido de la segunda membrana tendrá componentes fluidos que pasaron por la primera membrana, pero no la segunda. Un filtrado del segundo separador proporciona los componentes fluidos pasados por ambas membranas. Por lo tanto, es posible separar o clasificar tres tipos diferentes de partículas con este dispositivo. En general, es posible una matriz con múltiples separadores.

De nuevo, el dispositivo microfluídico integrado consiste principalmente en las mismas cuatro capas que se mencionaron anteriormente. Por lo tanto, no hay complejidad aumentada en términos de la fabricación. Por lo tanto, un dispositivo microfluídico integrado se puede fabricar rápidamente para separar/clasificar con más de 3 tamaños diferentes.

Las trazas paralelas de las líneas de control de presión a las regiones de presión correspondientes de los respectivos separadores pueden permitir el control consolidado y puertos y equipos neumáticos para operar las respectivas bombas peristálticas.

El dispositivo fabricado se aplicó para la aplicación en la separación de las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs) de microglia y astrocitos que se extrajeron del sistema nervioso central de rata. Se prepararon cultivos primarios mixtos de OPC a partir de cerebros de ratas Sprague-Dawley recién nacidas. Las meninges y los vasos sanguíneos se eliminaron de los hemisferios cerebrales en medio F-12 de Ham. Los tejidos se forzaron suavemente a través de una malla de nylon de 230  $\mu\text{m}$ . Las células disociadas se filtraron por gravedad usando el mismo tipo de malla. Este segundo filtrado se centrifugó durante 7 minutos a 1000 rpm, y el sedimento se resuspendió en medio Eagle modificado de Dubecco (DMEM) suplementado con 12,5% de suero de ternera fetal, 50 unidades/ml de penicilina y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina. Las células se plaquearon en matraces de 75  $\text{cm}^2$  revestidos con poli-L-ornitina y se incubaron a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Los matraces de células mixtas se usaron luego para experimentos de separación posteriores. Las OPC formaron menos del 10% de los cultivos celulares primarios, que se consideran células raras. Los OPCs se enriquecieron al menos 10 veces, y la eficacia de separación de OPCs puede alcanzar hasta el 95% (figura 11). La eficiencia de separación es ligeramente mayor cuando el dispositivo funciona a baja presión neumática (3 psi), lo que puede interpretarse como: algunas de las células de microglia y astrocitos cuyo tamaño es cercano a 10  $\mu\text{m}$  pueden apretarse y pasar a través del filtro, el número de esas celdas exprimidas y pasadas a través del filtro disminuye al

disminuir la presión neumática de operación. Nuestros experimentos también mostraron que las células separadas todavía eran biológicamente funcionales y se diferenciaban en oligodendrocitos maduros.

En conclusión, la verificación experimental de los separadores de microfluidos de la bomba peristáltica se ha llevado a cabo utilizando una variedad de problemas de separación, y se ha demostrado una buena evidencia de flujos turbulentos. Se espera que el uso de los separadores de microfluidos de bomba peristáltica tenga ventajas sustanciales sobre la técnica anterior, que no eran esperadas por los expertos en la materia.

Referencias:

1. T. F. Didar and M. Tabrizian, *Lab on a Chip*, 2010, 10, 3043-3053.
2. A. Lenshof and T. Laurell, *Chemical Society Reviews*, 2010, 39, 1203-1217.
3. S. Kim, S. Lee, and K. Suh, *Lab on a Chip*, 2008, 8, 1015-1023.
4. I. Barbulovic-Nad, X. Xuan, J. S. H. Lee and D. Li, *Lab on a Chip*, 2006, 6, 274-279.
5. C.-C. Lin, A. Chen and C.-H. Lin, *Biomedical Microdevices*, 2008, 10, 55-63.
6. A. Jonás and P. Zemánek *ELECTROPHORESIS*, 2008, 29, 4813-4851.
7. M. M. Wang, E. Tu, D. E. Raymond, J. M. Yang, H. Zhang, N. Hagen, B. Dees, E. M. Mercer, A. H. Forster, I. Kariv, P. J. Marchand and W. F. Butler, *Nature Biotechnology*, 2005, 23, 83-87.
8. E. K. Dirican, O. D. Ozgun, S. Akarsu, K. O. Akin, O. Ercan, M. Ugurlu, C. Camsari, O. Kanyilmaz, A. Kaya and A. Unsal, *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2008, 25, 375-381.
9. K. Hoshino, Y.-Y. Huang, N. Lane, M. Huebschman, J. W. Uhr, E. P. Frenkel and X. Zhang, *Lab on a Chip*, 2011, 11, 3449-3457.
10. Y. Zhou, Y. Wang and Q. Lin, *Journal of Microelectromechanical Systems*, 2010, 19, 743-751.
11. D. Issadore, H. Shao, J. Chung, A. Newton, M. Pittet, R. Weissleder and H. Lee, *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, 2011, 11, 147-151.
12. A. Nilsson, F. Petersson, H. Jönsson and T. Laurell, *Lab on a Chip*, 2004, 4, 131-135.
13. L. R. Huang, E. C. Cox, R. H. Austin and J. C. Sturm, *Science*, 2004, 304, 987-990.
14. J. Takagi, M. Yamada, M. Yasuda and M. Seki, *Lab on a Chip*, 2005, 5, 778-784.
15. A. A. S. Bhagat, H. W. Hou, L. D. Li, C. T. Lim and J. Han, *Lab on a Chip*, 2011, 11, 1870-1878.
16. J. Zhu, T. R. J. Tzeng and X. Xuan, *ELECTROPHORESIS*, 2010, 31, 1382-1388.
17. S. S. Kuntagowdanahalli, A. A. S. Bhagat, G. Kumar and I. Papautsky, *Lab on a Chip*, 2009, 9, 2973-2980.
18. Y. Luo and R. N. Zare, *Lab on a Chip*, 2008, 8, 1688-1694.
19. H. Wei, B. H. Chueh, H. Wu, E. W. Hall, C. -W. Li, R. Schirhagl, J. -M. Lin, and R. N. Zare, *Lab on a Chip*, 2011, 11, 238-245.

Otras ventajas que son inherentes a la estructura son obvias para un experto en la técnica. Las realizaciones se describen aquí de forma ilustrativa y no pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica. Las variaciones de las realizaciones anteriores serán evidentes para un experto en la materia y el inventor pretende abarcar las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

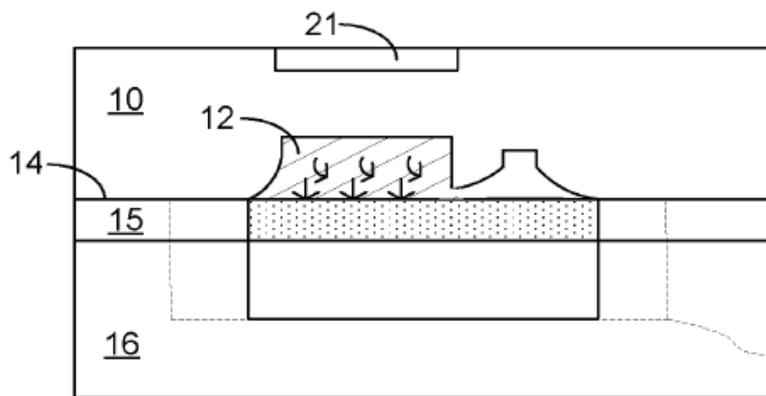
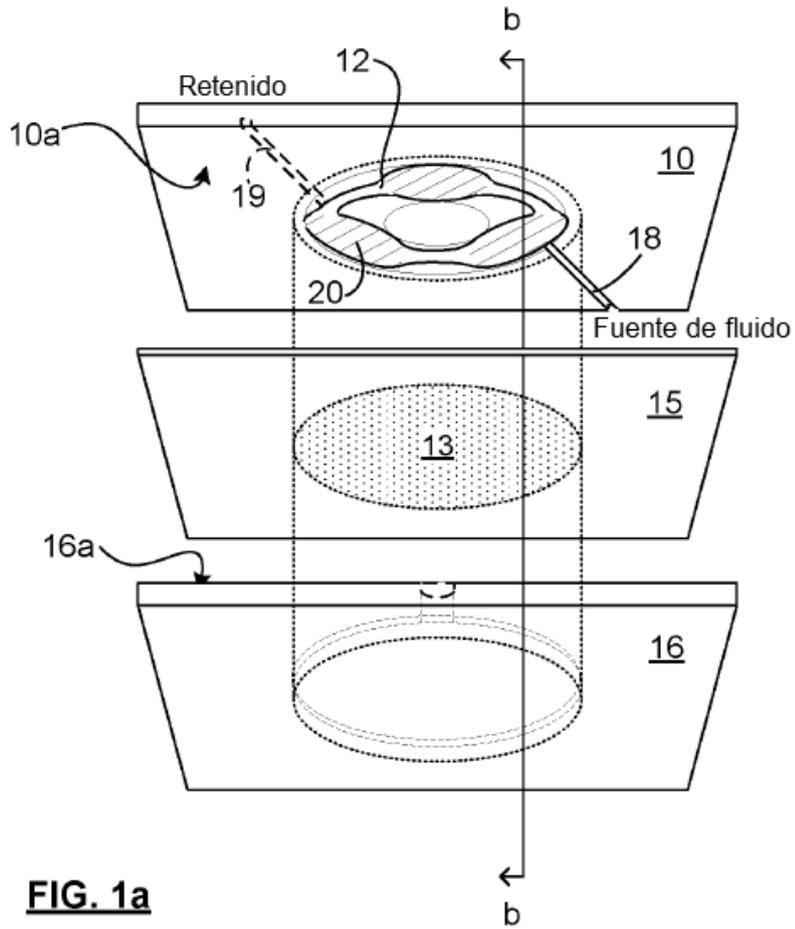
1. Un separador de microfluidos que comprende una bomba (10) peristáltica acoplada a una fuente y un canal retenido, un miembro (15) separador de componente fluido, y una salida (16) de filtrado, en donde:
- 5 la bomba peristáltica comprende al menos tres áreas de control de presión interconectadas por al menos un canal microfluido o nanofluido que recubre el miembro (15) separador, el al menos un canal (12) y áreas de control de presión que definen un circuito microfluido cerrado; y el miembro (15) separador está situado entre la bomba (10) peristáltica y la salida (16) de filtrado con una primera superficie del miembro de separación acoplada con al menos un canal (12), y una segunda superficie del miembro de separación acoplado con la salida (16) de filtrado para permitir selectivamente que los componentes fluidos pasen desde al menos un canal a la salida (16) de filtrado.
- 10 2. El separador de microfluidos de la reivindicación 1, en donde partes del al menos un canal y la salida de filtrado están alineadas respectivamente en una dirección neta de actuación de presión ejercida sobre el área de control de presión.
3. El separador de microfluidos de la reivindicación 1 o 2, en donde la bomba peristáltica comprende una capa elastomérica termoplástica que tiene una primera superficie con diseño unida al miembro de separación para definir el circuito microfluido cerrado.
- 15 4. El separador de microfluidos de la reivindicación 3 en donde la capa elastomérica termoplástica es sustancialmente plana, y de espesor uniforme, y la dirección neta de actuación de presión para cada área de control de presión es sustancialmente perpendicular a las superficies amplias de las capas.
5. El separador de microfluidos de la reivindicación 1, en donde el canal cubre al menos el 10%, más preferiblemente al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 50% de la primera superficie.
- 20 6. El separador de microfluidos de la reivindicación 1, en donde cada una de las al menos tres áreas de control de presión comprende un aumento de canal para el circuito microfluido cerrado.
7. El separador de microfluidos de la reivindicación 1, en donde el circuito microfluido cerrado tiene dos acoplamientos: un primer acoplamiento para suministrar un fluido de entrada a separar, y un segundo acoplamiento para eliminar un retenido.
- 25 8. El separador de microfluidos de la reivindicación 7, que comprende además al menos una válvula de control de flujo para abrir selectivamente el primer o el segundo acoplamiento.
9. El separador de microfluidos de la reivindicación 7 que comprende además un tercer acoplamiento al circuito microfluido cerrado o a un suministro del primer fluido, para suministrar selectivamente un fluido de lavado.
- 30 10. El separador de microfluidos de la reivindicación 1, en donde el miembro separador es: un filtro de superficie, un filtro de profundidad, una membrana, una membrana de ósmosis o ósmosis inversa, una membrana activada químicamente, un filtro electro osmótico, un gel de electroforesis, una membrana semipermeable, una membrana selectivamente permeable, una membrana biológica, una membrana sintética, una membrana pasiva, una membrana activa, una membrana activable, una membrana nanoporosa accionada eléctricamente, una membrana cargada, una membrana polarizada, una membrana neutra, una membrana porosa, una membrana de gradiente, membrana orgánica, membrana inorgánica, membrana líquida, membrana de gel, membrana semisólida, membrana sólida, membrana de emulsión, membrana reactiva o membrana foto reactiva.
- 35 11. El separador de microfluidos de la reivindicación 7 que comprende, además:
- al menos tres regiones de presión para aplicar presión a áreas de control de presión respectivas; y el controlador adaptado para controlar independientemente la presión en las al menos tres regiones de presión para accionar las al menos 3 áreas de control para producir en el canal una bomba de desplazamiento positivo que controla la administración del fluido de entrada al área de filtro.
- 40 12. El separador de microfluidos de la reivindicación 11 en donde las al menos tres regiones de presión se proporcionan alineadas con las áreas de control de presión modelando una capa elastomérica termoplástica en dos lados, proporcionando un lado el circuito microfluido cerrado, proporcionando el otro las regiones de presión, donde cada región de control de presión está alineada con un área de control de presión respectiva, y se forma una membrana entre ellas.
- 45 13. El separador de microfluidos de la reivindicación 12, en donde la bomba peristáltica comprende además una capa que recubre las regiones de presión, para formar cavidades cerradas dentro de las regiones de presión, para el control de las áreas de control de presión mediante el suministro controlado de fluido presurizado a las cavidades cerradas alrededor de las regiones de presión.
- 50

14. Un método para separar componentes de un fluido, que comprende:

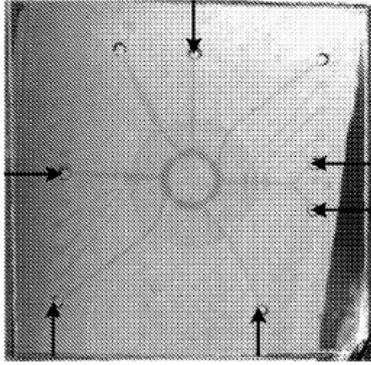
proporcionar un canal (12) micro o nano-fluídico autointersecable que define un camino cíclico para hacer circular el fluido sobre una superficie receptora de un miembro (15) separador de componente fluido, y

5 aplicar presión coordinada para canalizar en una pluralidad de áreas de control de presión a lo largo de la trayectoria cíclica para hacer circular el fluido sobre la superficie de recepción, aplicando una presión para fomentar una transmisión deseada a través del miembro (15) de separación, y una presión de circulación para eliminar obstrucciones superficiales en el miembro (15) de separación.

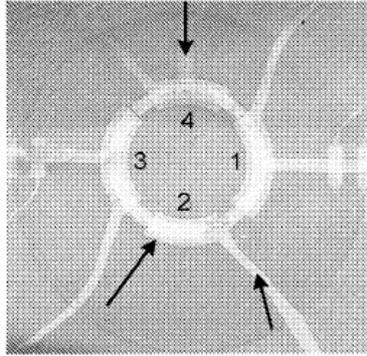
10 15. El método de la reivindicación 14 que comprende adicionalmente después de inyectar repetidamente el fluido hasta que se gasta el fluido, o el producto retenido contiene demasiado material que no puede pasar a través del miembro de separación, dispensar un fluido de lavado para enjuagar el producto retenido del canal, en donde dispensar un fluido de lavado comprende preferiblemente accionar una válvula para cerrar un suministro del fluido, o un filtrado del miembro de separación, o para abrir una salida del producto retenido.



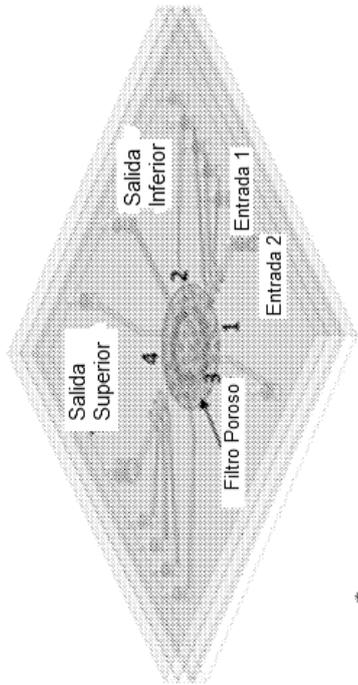
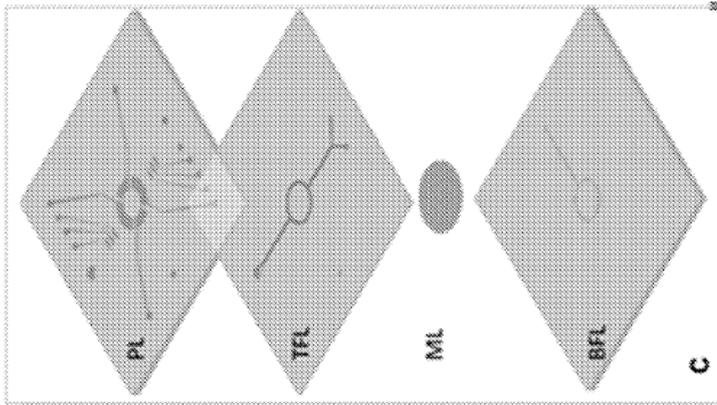
**FIG. 1b**



**FIG. 3a**



**FIG. 3b**

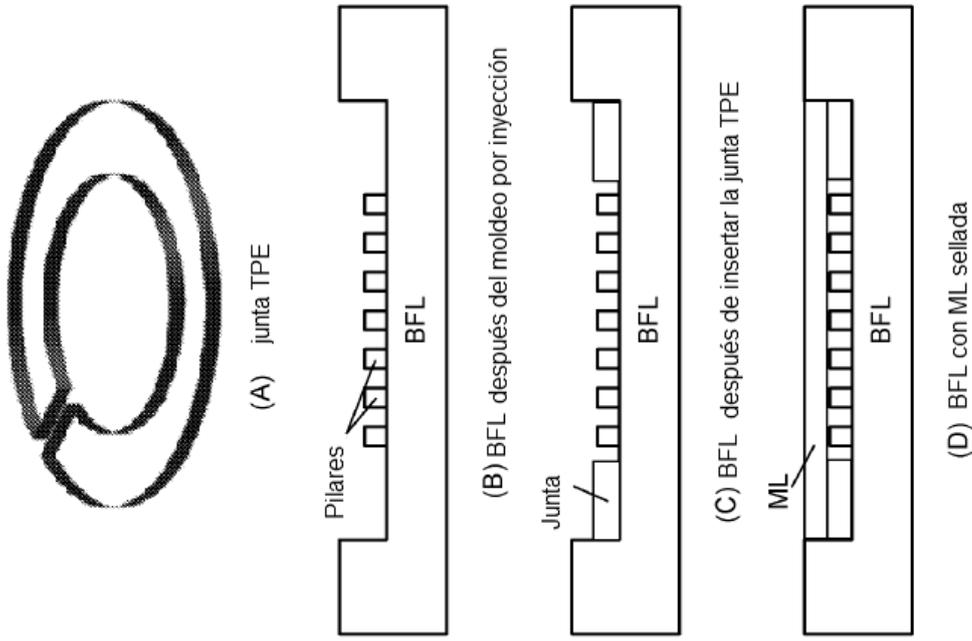


**a**

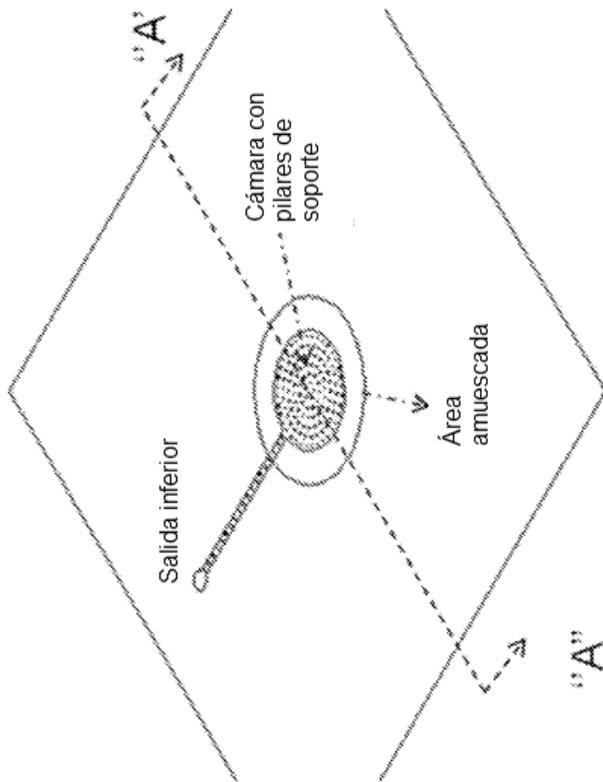


**b**

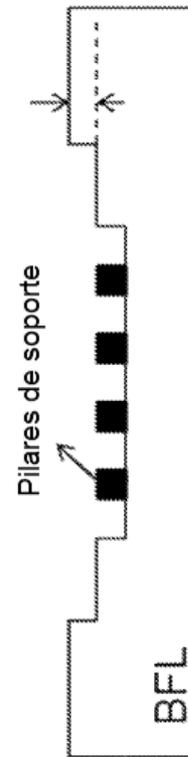
**FIG. 2**



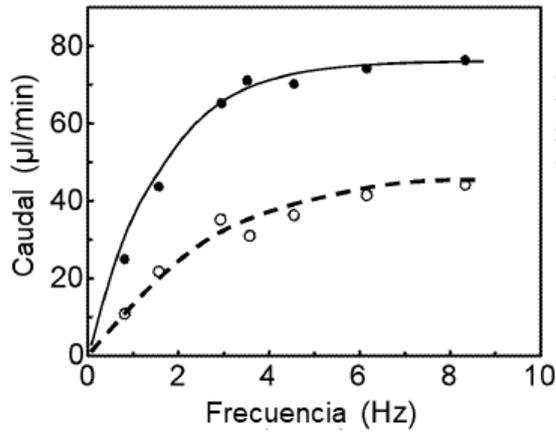
**FIG. 5**



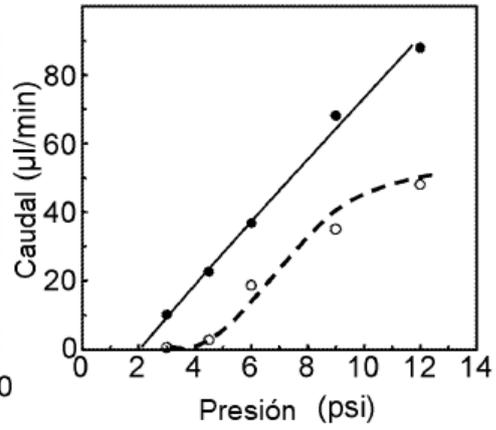
**FIG. 4**



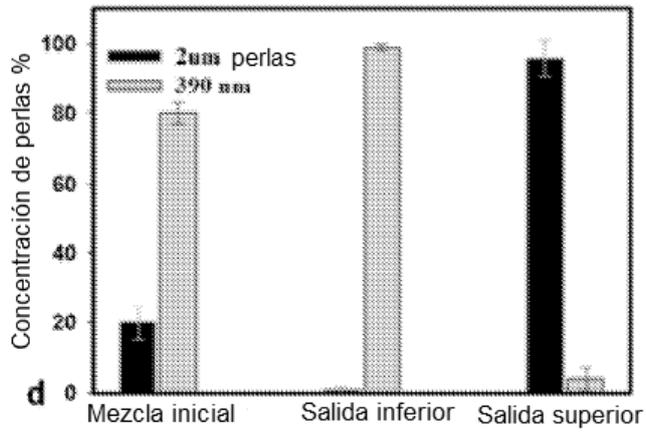
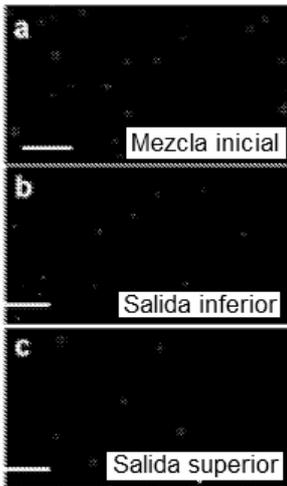
**FIG. 4A**



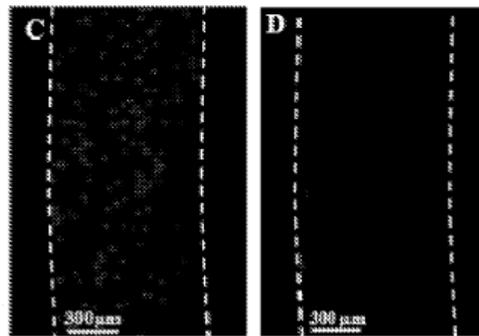
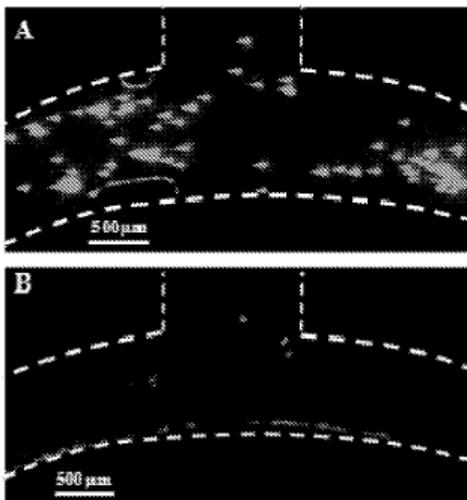
**FIG. 6(A)**



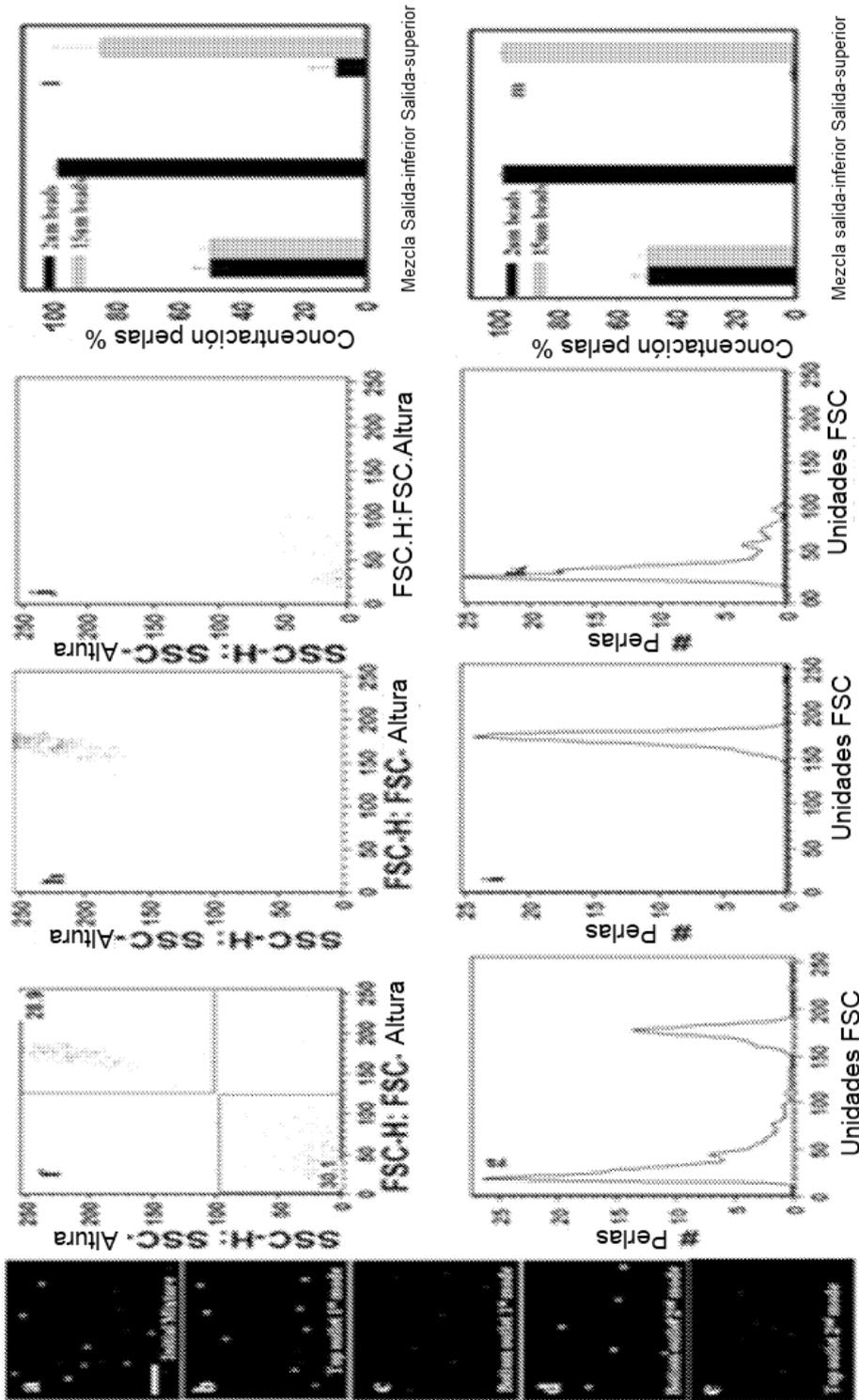
**FIG. 6(B)**



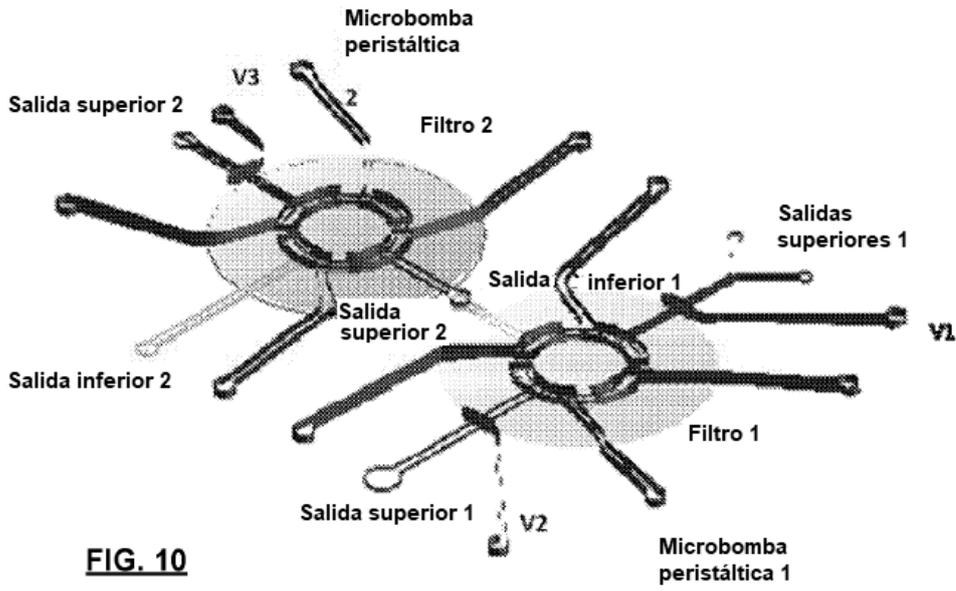
**FIG. 8**



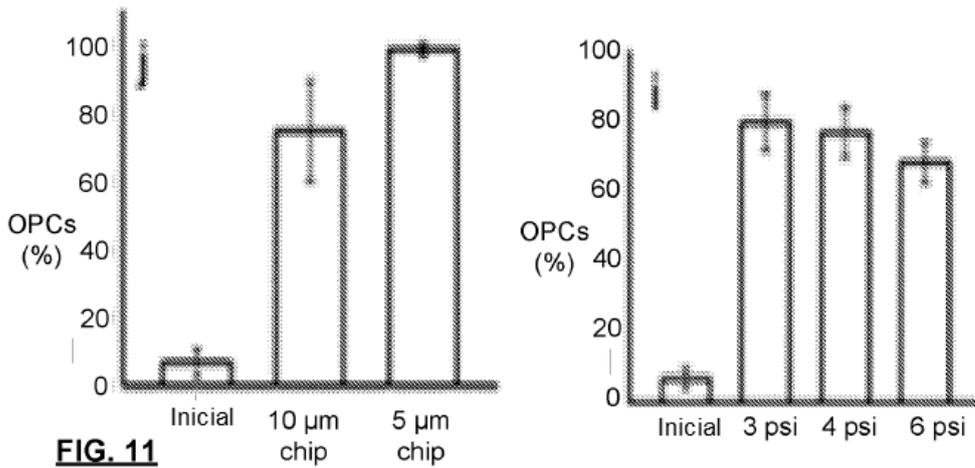
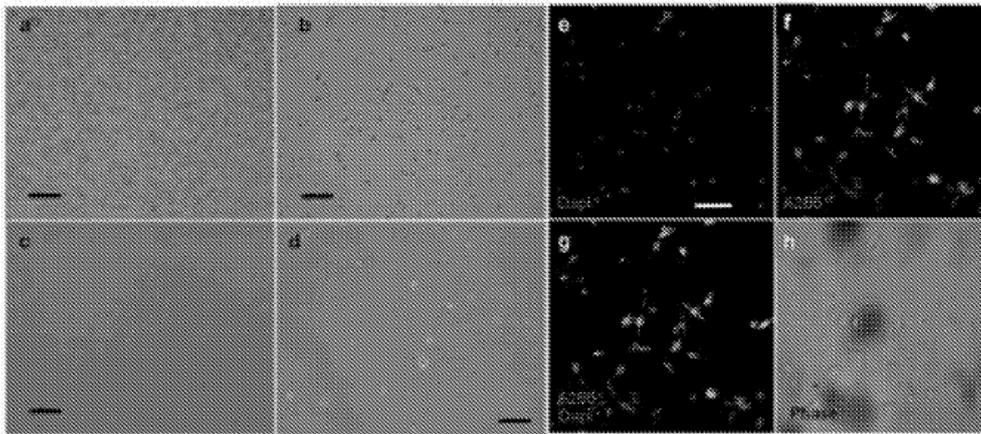
**FIG. 9**



**FIG. 7**



**FIG. 10**



**FIG. 11**