

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 712**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/10** (2006.01)

**G01N 15/02** (2006.01)

**B03C 5/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2005 E 12177401 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2540399**

54 Título: **Métodos para la separación y cuantificación de partículas**

30 Prioridad:

**07.07.2004 IT BO20040420**

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

**28.10.2019**

73 Titular/es:

**MENARINI SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)  
Via G. di Vittorio, 21 B/3  
40013 Castel Maggiore (BO), IT**

72 Inventor/es:

**MANARESI, NICOLÒ y  
MEDORO, GIANNI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 728 712 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**

Métodos para la separación y cuantificación de partículas

**5 Campo de la invención**

La presente invención pertenece a métodos para separar partículas con diferentes propiedades físicas y/o para medir la cantidad o el tamaño de las partículas. La invención encuentra aplicación principalmente en el análisis y la separación de muestras biológicas.

10

**Antecedentes de la invención**

La solicitud de patente PCT/WO 00/69565 de G. Medoro describe un aparato y un método para manipular y localizar partículas que usan jaulas cerradas de potencial dielectroforético.

15

Además de esto, el documento PCT/WO 00/69565 enseña métodos de separación. Un primer método se basa en la acción diferencial, en las poblaciones de diferentes células, de dielectroforesis (DEP) negativa (NDEP) y positiva (PDEP) y no permite discriminar partículas si ambas se someten a NDEP o PDEP. Otros métodos de separación en su lugar requieren usar información de sensores integrados en el dispositivo y no pueden implementarse cuando no hay dichos sensores.

20

Se conocen muchos otros métodos de separación que sin embargo requieren el uso de flujos de líquido, que es una característica indeseable en muchas aplicaciones, ya que requiere generar fluidos bien controlados. Una revisión de estos métodos, por encima de todo lo que se refiere al uso de la dielectroforesis, se da en *Electrophoresis* 2002, 23, 2569-2582 M. P. Hughes y en *Electrophoresis* 2002, 23, 1973-1983 P.R.C. Gascoyne, J. Vykoukal y en las referencias bibliográficas relacionadas.

25

En particular, la patente US 5.888.370 de Becker et al. enseña entre otras cosas a usar la dielectroforesis para determinar la altura de las partículas en un perfil de velocidad de flujo líquido, al que sigue la separación de las partículas.

30

OHARA T et Al. "Ratcheting electrophoresis microchip (REM) for programmable transport and separation of macromolecules", *Proceedings of the International Mechanical Engineering Congress and Exposition - IMECE - ASME*, vol. 3, 11 Noviembre 2001 (2001-11-11), páginas 619-628 no permite un control fiable. Otros métodos de separación basados en la dielectroforesis no requieren el uso de flujos de líquido, pero utilizan las denominadas Ondas de viaje (TWD, por sus siglas en inglés, de *Travelling waves*). Estos métodos se basan en la aplicación de una matriz de electrodos de voltajes sinusoidales a frecuencias de radio adecuadamente desplazadas de fase (por ejemplo, 0, 90, 180, 270 grados). El resultado es un campo eléctrico que viaja en el espacio a una velocidad (VTW) igual a la distancia entre los electrodos con la misma fase dividida por el periodo del voltaje sinusoidal único. El desplazamiento de fase entre la polarización inducida en la partícula y el campo eléctrico que lo genera provoca una traslación de la partícula, a una velocidad de órdenes de magnitud menores que la VTW y asíncrona con ella. En consecuencia no es posible mantener un control preciso de la posición de las partículas después de la separación, que puede ser deseable en muchas aplicaciones, por ejemplo si se desea determinar la cantidad de partículas separadas colocándolas encima de sensores.

35

40

45

Las limitaciones de la técnica conocida se reemplazan por la presente invención que permite separar partículas incluso si se someten a la misma fuerza (por ejemplo, NDEP), no requiere flujo de líquido y permite mantener un control de la posición de las partículas durante y después de la separación o medición.

**50 Sumario de la invención**

La presente invención pertenece a un método de acuerdo con la reivindicación 1 para separar partículas usando campos de fuerzas no uniformes, variables en el tiempo. Los campos de fuerzas pueden ser por dielectroforesis (positiva o negativa), electroforesis o movimiento electrohidrodinámico, caracterizado por un conjunto de puntos estables en equilibrio para las partículas.

55

Las propiedades físicas de las partículas determinan la velocidad con que se mueven, sometidas a la acción del campo de fuerza. Un primer objeto es aislar las partículas que están más afectadas por el campo de fuerza, en otras palabras, las partículas más rápidas. Un segundo objeto es aislar las partículas que están menos afectadas por el campo de fuerza, en otras palabras las partículas más lentas. Un tercer objeto es separar en una dirección las unas que están más afectadas por el campo de fuerza y en dirección opuesta las unas que están menos afectadas. Un objeto adicional es cuantificar indirectamente los grupos de partículas de un tipo determinando la velocidad de respuesta de los grupos de ellas o el tamaño de las partículas únicas.

60

En un aspecto del método, los puntos estables en equilibrio del campo se trasladan en el espacio a una velocidad sustancialmente comparable a la velocidad de traslación de las partículas más rápidas en la muestra de tal manera

65

que solamente estas sigan por la posición cambiante, mientras que las partículas más lentas no están afectadas.

De acuerdo con otro aspecto del método la traslación de estos puntos de equilibrio puede ocurrir también con velocidad variante, que es especialmente útil cuando esto ocurre con ley periódica en un campo con periodicidad espacial. En un aspecto del método, los puntos de equilibrio de un campo de fuerza con periodicidad espacial se trasladan en una primera dirección a alta velocidad, durante un periodo de tiempo tal para provocar un movimiento igual al periodo espacial del campo, y a baja velocidad en una segunda dirección, opuesta a la primera, durante un periodo de tiempo tal para cancelar el movimiento global del campo, provocando la traslación de las partículas más lentas en la segunda dirección y sin movimiento de las partículas más rápidas.

En un aspecto adicional del método, los puntos estables en equilibrio del campo se trasladan en una primera dirección a alta velocidad, durante un periodo de tiempo tal para provocar un movimiento igual al periodo espacial del campo menos una cantidad correspondiente al periodo de los electrodos que lo generan, provocando la traducción de las partículas más rápidas en la primera dirección y de las partículas más lentas en la dirección opuesta.

En otro aspecto del método las partículas, sujetas a la acción de la fuerza de gravedad, sufren una atenuación de los efectos de las fuerzas aplicadas de tal manera que induzcan una variación en la velocidad del movimiento, de esta manera determinando la separación de las partículas.

En otro aspecto del método, las partículas se agrupan por la fuerza de dielectroforesis y su velocidad de respuesta diferente a las traslaciones del campo se utiliza para determinar indirectamente la cantidad de partículas en el grupo o el tamaño de las partículas.

Un dispositivo que permite producir ventajosamente algunos de los métodos anteriormente mencionados, está compuesto solo por dos flechas de electrodos a los que se aplican diferentes potenciales variables en el tiempo.

En lo sucesivo en el presente documento, el término partículas se usará para indicar entidades micrométricas o nanométricas, naturales o artificiales, tales como células, componentes subcelulares, virus, liposomas, niosomas, microesferas y nanoesferas, o entidades incluso más pequeñas tales como macro-moléculas, proteínas, ADN, ARN, etc., así como gotas de líquido inmiscible en el medio de suspensión, por ejemplo aceite en agua o agua en aceite.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el principio de generación del campo de fuerza por medio de una matriz de electrodos.

La Figura 2 muestra algunos datos experimentales y simulaciones de velocidad de traslación de microesferas de poliestireno.

La Figura 3 muestra el principio de separación por medio de un campo que viaja a velocidad constante.

La Figura 4 muestra el principio de separación por medio de un campo que viaja a velocidad en aumento.

La Figura 5 muestra la separación de las partículas más rápidas por traslación periódica de un campo periódico.

La Figura 6 muestra la separación de las partículas más rápidas por traslación periódica de un campo periódico para una configuración del campo diferente.

La Figura 7 muestra la separación de las partículas más lentas por traslación periódica de un campo periódico.

La Figura 8 muestra la separación en direcciones opuestas de las partículas más rápidas y las partículas más lentas por traslación periódica de un campo periódico.

La Figura 9 muestra los resultados experimentales de separación en direcciones opuestas.

La Figura 10 muestra los resultados experimentales de campos de traslación de intensidad en disminución.

La Figura 11 muestra un diagrama de la relación entre la velocidad de un grupo de partículas y el número de partículas que lo componen.

La Figura 12 muestra un diagrama de la relación entre la velocidad de las partículas hechas del mismo material homogéneo y el diámetro de la partícula.

La Figura 13 muestra el principio de determinación de la velocidad crítica de un grupo (o una única) de partículas, para determinar su número (o su diámetro).

### Descripción detallada de la invención

El fin de la invención es proporcionar un método para la separación de partículas de acuerdo con sus propiedades físicas o su cuantificación o la determinación de su tamaño. El método se basa en el uso de un campo (F) de fuerza no uniforme. Este campo puede por ejemplo ser un campo de dielectroforesis (DEP) negativa (NDEP) o positiva (PDEP), un campo electroforético (EF) o un campo de movimiento electrohidrodinámico (EHD).

### Generación del campo de fuerza

La Figura 1 muestra algunos métodos de generación del campo de fuerza, de acuerdo con la técnica conocida, usando una matriz de electrodos (EL), realizada en al menos un sustrato (SUB, SUB2). Una cubierta (LID), que puede a su vez ser un electrodo, limita una micro-cámara, en uso cargada con un líquido que tiene una cierta

viscosidad. En el caso de DEP, los voltajes aplicados son voltajes periódicos (preferentemente sinusoidales) en fase (+) y contra-fase (-). Los voltajes a contra-fase se entiende que son voltajes desplazados de fase en 180 grados. El campo genera una fuerza (F) que actúa tanto en partículas más rápidas (FP) como en partículas más lentas (SP), ambas atraídas hacia puntos de equilibrio (PEQ).

Dependiendo de la configuración de los voltajes aplicados es posible identificar coordinados (DEPC) que corresponden a la posición del punto de equilibrio estable (PEQ), y coordinados (WS) que corresponden a puntos de equilibrio inestable, esto es al límite de la cuenca de atracción de diferentes puntos de equilibrio estable. Estas líneas forman de forma ideal una clase de línea divisoria que determina hacia qué punto de equilibrio estable tiende a ir la partícula. En el caso de DEP negativa (NDEP), es posible hacer jaulas de fuerza cerrada si la cubierta (LID) es un electrodo conductor. El punto de equilibrio (PEQ) se encuentra normalmente en el líquido a una cierta altura en comparación con los electrodos, de tal manera que las partículas (SP, FP) están, en estado estacionario, en levitación. En el caso de DEP positiva (PDEP), el punto de equilibrio (PEQ) se encuentra normalmente en correspondencia con la superficie en la que se hacen los electrodos y las partículas (FP, SP) están, en estado estacionario, en contacto con él. Para PDEP no es necesario tener electrodos adicionales en la cubierta debido a que los puntos de equilibrio de PDEP corresponden al máximo del campo eléctrico.

El campo puede tener una periodicidad espacial (CPIT) que es un múltiplo de la periodicidad de los electrodos (EPIT), en los casos en que estos pueden definirse.

### **Propiedad de separación**

Cuando los puntos de equilibrio estable del campo de fuerza (F) se mueven por una etapa (EPIT) que cambia la configuración de los voltajes (+, -) aplicados a los electrodos (EL), las partículas convergen hacia el nuevo punto de equilibrio con un tiempo que depende sustancialmente de la relación entre la fuerza de fricción viscosa y la fuerza del campo (F). La Figura 2 muestra algunos datos experimentales y las simulaciones del tiempo necesario para completar un movimiento igual a media etapa EPIT que sigue al movimiento de los puntos de equilibrio del campo de fuerza de una etapa EPIT (en el caso específico igual a 25  $\mu\text{m}$ ), para microesferas de poliestireno sometido a NDEP, respectivamente 3  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, dependiendo de la amplitud de pico a pico del voltaje sinusoidal aplicado a los electrodos. Para el mismo material de partículas, la fuerza del campo (F) es proporcional al volumen, esto es al cubo del radio, mientras que la fuerza viscosa es proporcional al radio, por lo que las partículas con un radio mayor se moverán más rápido (FP) que aquellas de diámetro más pequeño (SP). Este efecto se explota, de acuerdo con la invención, a separar las partículas o cuantificar grupos de partículas o a determinar el tamaño de dichas partículas, como se describe a continuación en el presente documento. Es evidente para los expertos en el sector con habilidades ordinarias que la diferencia en la velocidad también puede ocurrir para partículas del mismo diámetro (misma fuerza de fricción viscosa), sobre la que el campo de fuerza (F) actúa con diferente intensidad. En este caso las partículas sobre las que actúa con mayor intensidad (FP) son más rápidas que aquellas sobre las que actúa con menor intensidad (SP).

Es además evidente que el método se aplica eficazmente también en casos en que el campo actúa con la misma fuerza en todas las partículas, pero la fricción viscosa es diferente debido, por ejemplo, al material o la forma diferentes de las partículas.

El principio de la separación explota el equilibrio entre una fuerza generada por el campo (F), no uniforme en el espacio y que se mueve de una manera controlada, y una fuerza que actúa uniformemente. Esto puede ser la fricción viscosa, como se describe anteriormente, pero también, por ejemplo, la fuerza de la gravedad. Por ejemplo, dos partículas sobre las que actúa el campo (F) con la misma fuerza y que tienen la misma fricción viscosa (por ejemplo que tienen el mismo diámetro) sin embargo serían capaces de tener diferente masa. En este caso, inclinar el dispositivo de tal manera que la fuerza de gravedad tenga un componente no nulo en la dirección de movimiento del campo de fuerza (F) provocaría que las partículas tuvieran una velocidad diferente, de manera que sea posible de cualquier manera aplicar el método. En general, una propiedad física diferente entre las partículas es suficiente para permitir la separación. Las propiedades físicas de acuerdo con las que las partículas se discriminan pueden ser por ejemplo el diámetro, la forma, el material de que están hechos o la proporción relativa y la disposición de los materiales de componentes, o incluso las propiedades de superficie. En otros casos pueden incluir la carga eléctrica. Pueden ser también obviamente combinaciones de las propiedades anteriormente mencionadas. A modo de ejemplo, pero sin restringirse al fin de la invención los presentes inventores pueden mencionar la separación de:

- células del mismo tipo pero de dimensiones diferentes;
- células del mismo tipo pero con diferentes propiedades funcionales;
- células espermáticas con anomalías morfológicas de células espermáticas normales;
- células de las mismas dimensiones pero con una composición diferente del citoplasma;
- células apoptóticas de células vitales;
- células infectadas con virus o parásitos intracelulares de células no infectadas;

- células infectadas con SIDA de células no infectadas;
- células infectadas con malaria de células no infectadas;
- células infectadas con *Chlamydia* de células no infectadas;

- 5
- células decoradas con anticuerpos de células no decoradas;
  - células de diferentes tipos:

- células rojas de la sangre de linfocitos;
- células rojas de la sangre de células eritromieloides;
- células espermáticas de células epiteliales vaginales;

10

- liposomas de diferentes dimensiones pero con el mismo contenido;
- microesferas de diferentes dimensiones;

15

- esferas de poliestireno de 3  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ ;
- esferas de 6  $\mu\text{m}$  y 15  $\mu\text{m}$ ;

- microesferas de las mismas dimensiones pero con diferentes funcionalidades de superficie;

20

- esferas de 3  $\mu\text{m}$  funcionalizadas con grupos amina y esferas no funcionalizadas;

- microesferas de las mismas dimensiones pero con diferente carga superficial;
- microesferas cargadas positivamente de microesferas neutras;
- células de virus

25

- virus de diferentes tipos
- fragmentos de ADN de diferente peso molecular;
- proteínas con una relación diferente entre masa y carga.

**Método de separación con velocidad aperiódica (onda única)**

30

La Figura 3 muestra un primer aspecto del método de acuerdo con la invención que lleva a cabo la separación por medio de un campo que se traslada a una velocidad constante. Inicialmente todas las partículas se atraen en la misma posición (DEPC) que corresponde al único punto de equilibrio. El campo se traslada una distancia discreta igual a la etapa de repetición (EPIT) a una velocidad promedio  $V_F$  definida como la relación entre la etapa de repetición (EPIT) y el tiempo  $t_f$  transcurrido para que el campo avance una distancia igual a EPIT, esto es  $V_F = EPIT/t_f$ . Solamente las partículas (FP) capaces de moverse a una velocidad igual a o mayor que  $V_F$  pueden seguir la traslación continuamente.

35

40

Las partículas más lentas (SP) no pueden seguir y terminan retrasándose atrás. Como resultado pueden mantenerse más atrás del punto de atracción del campo, tanto como para padecer su atracción menos y menos deteniéndose más o menos cerca del punto de partida. Alternativamente, estas partículas lentas pueden recogerse de un nuevo punto de equilibrio a crearse por ejemplo en el coordinado de partida NDEPC. Opcionalmente, es posible repetir la separación con una velocidad de traslación más lenta ( $t_f$  mayor) para segregar adicionalmente las partículas re-recogidas en el punto de partida de poblaciones con diferente velocidad.

45

Igualmente que lo anterior, la separación puede realizarse con la velocidad de traslación del punto de atracción aumentado con el tiempo. En este caso, ilustrado por ejemplo en la Figura 4, las partículas siguen inicialmente el coordinado (DEPC) del punto de atracción, hasta que la velocidad de traslación excede su límite de velocidad en respuesta al campo. En este caso también es posible crear nuevos puntos de atracción (NDEPC) para recoger las partículas que quedaron detrás.

50

Está claro que el método también se aplica cuando el campo de fuerza de partida no tiene un único punto de equilibrio sino una multiplicidad de puntos.

55

La misma técnica de separación es practicable usando movimientos a trozos continuos o discontinuos del campo de fuerzas en el espacio.

**Método de separación con velocidad periódica**

60

La velocidad de traslación del campo de fuerza (F) también puede ser periódico. Esto es especialmente útil cuando el campo de fuerza tiene periodicidad espacial (CPIT). Por simplicidad los presentes inventores definen el número *pitch* =  $CPIT / EPIT$  que representa el periodo de repetición del campo expresado en el número de electrodos. Algunos aspectos del método se listan aquí abajo.

65

Traslación de partículas rápidas

La Figura 5 muestra la separación de las partículas más rápidas por traslación con velocidad periódica (VF) teniendo un periodo (tp) de un campo de fuerza periódico. Durante un primer periodo de tiempo  $pitch \cdot t_f$  el campo se traslada a una velocidad promedio constante  $V_F = EPIT/t_f$ , de tal manera que provoque la traslación del campo igual a un periodo espacial (CPIT). Durante un segundo periodo de tiempo (tw) el campo se mantiene estacionario, permitiendo a las partículas alcanzar un nuevo punto de equilibrio, que corresponde al coordinado de partida original para las partículas más lentas (SP) y a una nueva posición, trasladadas al mismo grado que la traslación del campo (CPIT), para las partículas más rápidas (FP). En este caso la velocidad crítica que se distingue es:

$$v_{ws} = \frac{CPIT/2}{(pitch-1) \cdot t_f} = \frac{CPIT}{CPIT - EPIT} \cdot V_F / 2.$$

$$t_{ws} = \frac{EPIT}{v_{ws}} = 2 \frac{CPIT - EPIT}{CPIT} t_f.$$

En términos de tiempo, puede definirse un tiempo crítico convencional

Las partículas que tardan más que este tiempo en completar una etapa volverán a la posición de partida. En realidad, la fuerza a lo largo del eje X normalmente no es constante. Por lo tanto también la velocidad limitante que se obtiene cuando hay equilibrio con la fricción viscosa no es constante entre WS y DEPC. En consecuencia, la fórmula anterior es indicativa y debe corregirse empíricamente o determinarse por medio de simulaciones numéricas para que tenga un valor más preciso. El tiempo de espera (tw), en el que el campo se mantiene estacionario para permitir el asentamiento, en la posición original para las partículas más lentas (SP), en la nueva posición para las partículas más rápidas (FP), es indicativamente igual a al menos  $t_w = \alpha_w (pitch - 2) \cdot t_f$ , donde el factor  $\alpha_w \geq 1$  tiene en cuenta el hecho de que la velocidad de asentamiento es típicamente menor que durante la traslación. De hecho, durante la traslación las partículas están durante la mayoría del tiempo en regiones del campo donde la fuerza es más intensa y por lo tanto se están moviendo más rápido.

El periodo total es por lo tanto  $t_p = [pitch + \alpha_f \cdot (pitch - 2)] \cdot t_f$ . Los presentes inventores son capaces desde aquí de definir la velocidad promedio de separación  $v_{sep} = CPIT/t_p = V_F/[pitch + \alpha_f \cdot (pitch - 2)]$ , a la que las partículas más rápidas (FP) se mueven en el periodo, que es aquellos para que  $v \geq v_{ws}$ . La Figura 6 muestra la separación de las partículas más rápidas como se describe anteriormente para una configuración de campo diferente.

Traslación de partículas lentas

La Figura 7 muestra la separación de las partículas más lentas por traslación con velocidad (VF) periódica (tp) en un campo de fuerza periódico. El método es, para una primera parte, totalmente similar al método anterior de separación de partículas rápidas en una primera dirección, al que se añade una segunda parte durante la que tanto las partículas rápidas (FP) como las lentas (SP) se trasladan en una segunda dirección, opuesta a la primera, para obtener una traslación neta de las partículas más lentas (SP) en la segunda dirección y sin movimiento de las partículas más rápidas. La velocidad crítica  $v_{ws}$  y el tiempo crítico  $t_{ws}$ , se mantienen aquellos definidos para el caso anterior, incluso si en este caso las partículas que se trasladan son aquellas con velocidades más bajas,  $v \leq v_{ws}$ , y más tiempo para completar una etapa,  $t > t_{ws}$ . El tiempo  $t_b$  define un segundo límite de velocidad. Las partículas que son demasiado lentas (para las que  $v < v_{ws2} = EPIT/t_b$ ) no son capaces de seguir enteramente los movimientos en la segunda dirección.

Por lo tanto pierden la sincronía con los movimientos del campo y se mantienen sustancialmente estacionarias o apenas se mueven en una dirección que es difícil de predecir. El periodo total del ciclo es  $t_p = pitch \cdot (t_f + t_b) + t_w$ . A partir de esto, uno obtiene la velocidad promedio de separación  $v_{sep} = CPIT/t_p = CPIT/[pitch \cdot (t_f + t_b) + t_w]$ , a la que las partículas seleccionadas (SP) se mueven en el periodo, esto es aquellas para las que  $v < v_{ws}$ .

Traslación de partículas lentas y rápidas en direcciones opuestas

La Figura 8 muestra la separación en direcciones opuestas de las partículas más rápidas y de las partículas más lentas por traslación periódica en un campo periódico.

Durante un primer periodo de tiempo  $(pitch-1) \cdot t_f$  el campo se traslada en una primera dirección a una velocidad promedio constante en el periodo espacial EPIT igual a  $V_F = EPIT/t_f$ , de tal manera que provoque la traslación total del campo igual a  $(pitch - 1) \cdot EPIT$ . Durante un segundo periodo de tiempo (tw) el campo se mantiene inmóvil, permitiendo que las partículas alcancen un nuevo punto de equilibrio, variando su coordinado, con referencia a la posición original y la dirección de traslación del campo, de  $- EPIT$  para las partículas más lentas (SP) y  $CPIT - EPIT$  para las partículas más largas (FP).

En este caso la velocidad crítica que se distingue es:  $v_{ws} = \frac{CPIT - 2 \cdot EPIT}{2} \cdot \frac{1}{(pitch - 2) \cdot t_f} = V_F / 2$ . Y el tiempo crítico convencional es  $t_{ws} = EPIT/v_{ws} = 2 \cdot t_f$ . Las partículas que tardan más que este tiempo en completar una etapa volverán a la categoría de partículas lentas (SP), las que tarden menos a la categoría de partículas rápidas (FP).

El segundo periodo de tiempo en el que el campo se mantiene inmóvil para permitir que las partículas lentas

alcancen el nuevo punto de equilibrio debe ser más grande que  $t_w = \alpha_w(\text{pitch}-1) \cdot t_f$ , donde el factor  $\alpha_w \geq 1$  tiene en cuenta el hecho de que el tiempo de asentamiento para alcanzar el nuevo punto de equilibrio partiendo del coordinado WS es típicamente mayor que el tiempo requerido desde un punto de equilibrio a WS, como se analiza anteriormente. En este caso, también, el valor real de  $t_w$  determina un límite adicional. Las partículas que son excesivamente lentas que no son capaces en este tiempo de recuperar el punto de equilibrio en - EPIT pierden su sincronía.

Ya que la traslación anteriormente descrita debe realizarse un número de veces igual a *pitch* para completar una traslación igual al periodo del campo, el periodo del ciclo de separación puede definirse como

$$t_p = \text{pitch} \cdot [(\text{pitch}-1) \cdot t_f + t_w] = \text{pitch} \cdot [(1 + \alpha_w)(\text{pitch}-1) \cdot t_f]$$

En este periodo las partículas lentas se trasladan por  $DXSP = -\text{pitch} \cdot EPIT$  y las rápidas por  $DXFP = \text{pitch} \cdot (\text{pitch}-1) \cdot EPIT$ . La velocidad de separación es  $v_{sepFP} = \frac{EPIT}{(1 + \alpha_w) \cdot t_f}$  y para las partículas rápidas (FP) y

1) EPIT. La velocidad de separación es  $v_{sepSP} = -\frac{EPIT}{(1 + \alpha_w) \cdot (\text{pitch}-1) \cdot t_f}$  para las partículas lentas (SP).

La Figura 9 muestra resultados experimentales de separación en direcciones opuestas con microperlas de poliestireno de 10  $\mu\text{m}$  (SP) y 25  $\mu\text{m}$  (FP) en una solución acuosa, atrapada por NDEO en jaulas móviles de dielectroforesis, en un dispositivo con electrodos alargados de 45  $\mu\text{m}$  de ancho y un hueco de 5  $\mu\text{m}$  (EPIT = 50  $\mu\text{m}$ ). La cubierta transparente conductora crea una microcámara de 130  $\mu\text{m}$  de altura. Los voltajes aplicados son 4,7 Vpp a 1 MHz. En correspondencia con los electrodos con fase (-), como la cubierta, se fabrican las jaulas de fuerza (DEPC) (con *pitch*=3). Las fotos se refieren a la condición inicial (ETAPA1) y a las siguientes dos etapas (ETAPA2, ETAPA3) para la primera iteración de traslación del campo según el diagrama de la Figura 8.

Es evidente para los expertos en el sector con capacidades ordinarias que pueden realizarse otros métodos, de acuerdo con la invención, como una combinación de los métodos anteriores. Por ejemplo la traslación periódica de partículas rápidas en las que, en el periodo, el campo se traslada por un múltiplo del periodo espacial del campo. O la repetición en la secuencia de la separación con velocidad periódica de partículas rápidas, pero para la velocidad ( $V_F$ ) del campo de fuerza disminuye, de tal manera que segregue las partículas de la población inicial en una serie de grupos, donde cada grupo se caracteriza por un intervalo de velocidad.

Es además evidente que también es fácil generalizar, en lo que respecta al caso de NDEP, los métodos anteriormente descritos de los casos en los que las *dimensiones* de la jaula son múltiplos de un electrodo único (por ejemplo, la jaula se genera por dos electrodos adyacentes en fase (-) con la cubierta y rodeada de electrodos en la fase opuesta (+), en lugar de por un electrodo único).

Es en último lugar evidente que el caso anteriormente descrito que se refiere a una traslación del campo de fuerza (F) puede generalizarse fácilmente a otros tipos de movimiento, tales como por ejemplo una *rotación*, ya que podría ser útil para una matriz simétrica de electrodos en relación a un punto (en lugar de un eje). Por simplicidad sin embargo se hará referencia, también en la continuación de la descripción, a traslaciones.

#### **Método de separación con voltajes no uniformes**

Además, es posible variar la intensidad de los voltajes aplicados a los electrodos durante la traslación. Esto implica generalmente una variación en la intensidad del campo, que sin embargo mantiene la misma configuración para las líneas de fuerza. Por ejemplo, es posible trasladar el campo (F) a una velocidad constante para separar las partículas rápidas, pero disminuir su intensidad durante el tiempo, de manera que solamente las partículas que responden más (FP) sigan el campo, mientras que aquellas (SP) menos afectadas por el campo, en relación a la fuerza de fricción viscosa, se mantienen atrás y pierden su etapa. Un ejemplo se da en la Figura 10.

#### **Método para cuantificar grupos de partículas por medición indirecta de la velocidad de traslación**

En los métodos anteriores es una ventaja que la densidad de las partículas sujetas al campo no es tal que afecte sustancialmente a la velocidad de traslación de partículas únicas debido a sus interacciones mutuas. De hecho, cuando se agrupan juntas, incluso las partículas pequeñas se comportan como partículas más grandes, aproximadamente con un volumen equivalente a la suma de los volúmenes de las partículas únicas, como se muestra en la Figura 11.

De acuerdo con un método adicional de la invención, ilustrado en la Figura 13, este efecto se utiliza para identificar la cantidad de partículas (N) que forman la muestra a analizar.

Partiendo de una muestra homogénea con una concentración desconocida de partículas de velocidad conocida, se determina la posición de un grupo de partículas.

5 Después el punto de equilibrio estable entre dos posiciones se mueve, a velocidad conocida ( $V_{fh}$ ), verificando si el grupo responde a este cambio en el campo con un movimiento correspondiente de la posición de reposo. Si esto no es así, la velocidad crítica del grupo de partículas es evidentemente menor que la velocidad de movimiento del punto de equilibrio estable ( $V_{fh}$ ). Después de un periodo de espera ( $t_w$ ), para permitir que las partículas se asienten en su punto inicial, el movimiento del campo se repite a una velocidad menor ( $V_{fl}$ ), hasta que las partículas son capaces de seguir el movimiento de la posición de reposo, que indica que la velocidad crítica de las partículas es más alta.

10 Repitiendo la medición para identificar al menos una velocidad de movimiento del campo mayor que la velocidad crítica y una menor, se determina un intervalo dentro del que debe incluirse necesariamente la velocidad crítica del grupo de partículas, que corresponde a un intervalo específico de cantidad de partículas. De esta manera, conociendo el intervalo en el que cae la velocidad crítica  $v_{ws}$  se puede calcular el volumen total de las partículas en el grupo (con una cierta aproximación relacionada con la anchura del intervalo) usando la relación entre volumen y velocidad que es idealmente lineal. Si esta relación no es lineal, la relación puede determinarse experimentalmente, produciendo una pre-caracterización del parámetro objeto de la medición, que es la cantidad de partículas en la muestra. La búsqueda de la velocidad crítica puede realizarse de varias maneras, por ejemplo con búsqueda binaria o lineal.

20 La posición puede medirse con sensores integrados o externos del tipo óptico, impedenciométrico, etc. de acuerdo con la técnica conocida.

Si la sensibilidad de estos sensores no fuera adecuada para detectar la presencia de la cantidad inicial de las partículas en un electrodo, de acuerdo con la invención la cantidad debe aumentarse, concentrando el contenido de varias jaulas, para permitir la detección y explotar la relación lineal o la pre-caracterización para determinar la cantidad medida.

25

***Método de determinación del tamaño de partículas por medición indirecta de la velocidad de traslación***

30 El método anteriormente descrito para la cuantificación de partículas puede aplicarse de manera similar al problema de determinar el tamaño de las partículas. Para este fin, los presentes inventores actúan en grupos de partículas no interactivas o unas con interacción despreciable entre sí. En este caso, como se ilustra en la Figura 12, para obtener el tamaño de las partículas únicas los presentes inventores usan la relación entre la velocidad de las partículas ( $V_{partícula}$ ) y su diámetro ( $D_{partícula}$ ).

35

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la separación de partículas de un primer tipo (FP) y un segundo tipo (SP) que comprende las etapas de:

- i. generar un campo de fuerza (F1) **caracterizado por** al menos un punto (SEP) de equilibrio estable dentro del que se atraen dichas partículas (FP, SP); y
- ii. hacer al menos un movimiento en el espacio de dicho al menos un punto (SEP) de equilibrio estable;

por el que las partículas de dicho primer tipo (FP) se someten a seguir el movimiento en el espacio de dicho al menos un punto (SEP) de equilibrio estable con una primera velocidad de movimiento (VFP); y las partículas de dicho segundo tipo (SP) se someten a seguir el movimiento en el espacio de dicho al menos un punto de equilibrio estable (SEP) con una segunda velocidad de movimiento (VSP) menor que la primera velocidad (VFP); en el que

- dicho al menos un movimiento del al menos un punto de equilibrio estable (SEP) se lleva a cabo con una velocidad (VF) sustancialmente comparable a la primera velocidad de movimiento (VFP) y sustancialmente diferente de la segunda velocidad de movimiento (VSP) durante un intervalo de tiempo suficiente para dejar que las partículas del primer tipo (VP) sigan la traslación de dicho al menos un punto de equilibrio estable continuamente y dejar a las partículas del segundo tipo (SP) que se queden atrás rezagadas, progresivamente menos y menos atraídas hacia dicho al menos un punto de equilibrio estable (SEP), para separarse eficazmente de las partículas del primer tipo (VP);
- dicho campo de fuerza (F) generándose por al menos una matriz de electrodos (EL), sustancialmente plana, hecha en un primer sustrato (SUB).

2. Un método como en la reivindicación 1, **caracterizado por** el hecho de que dicho campo de fuerza (F) se genera por al menos una de las siguientes fuerzas:

- i. dielectroforesis positiva (pDEP),
- ii. dielectroforesis negativa (nDEP).
- iii. electroforesis (EF),
- iv. movimientos electrohidrodinámicos (EHD).

3. Un método como en la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por** el hecho de que dichas velocidades de movimiento (VFP, VSP) son tales que se ven afectadas, sustancialmente de formas diferentes, por al menos una de las siguientes fuerzas:

- i. fricción viscosa (NI),
- ii. gravedad (G).

4. Un método como en las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** el hecho de que dicho campo de fuerza (F) posee una serie de puntos de equilibrio estable (SEP) con una periodicidad espacial (CPIT) en al menos una región del espacio.

5. Un método como en la reivindicación 4, **caracterizado por** el hecho de que el movimiento en el espacio de dicha serie de puntos de equilibrio estable (SEP) ajustados con una periodicidad espacial (CPIT) en al menos una región del espacio.

6. Un método como en la reivindicación 5, que comprende las etapas de:

- i. mover dicha serie de puntos de equilibrio estable de dicho campo (F) con velocidad de movimiento (VF) comparable a la velocidad de movimiento (VFP) de dichas partículas de un primer tipo (FP), en una dirección (X), durante un primer periodo de tiempo correspondiente al tiempo necesario para que dicha serie de puntos de equilibrio estable (SEP) se mueva en un espacio igual a un periodo espacial (CPIT);
- ii. detener el movimiento de dicho campo durante un segundo periodo de tiempo (TW);

para obtener un movimiento neto de solamente dichas partículas de un primer tipo (FP) en dicha dirección (X).

7. Un método como en la reivindicación 5, que comprende las etapas de:

- i. mover dicha serie de puntos de equilibrio estable (SEP) de dicho campo (F) con una primera velocidad de movimiento (VF) comparable a la velocidad de movimiento (VFP) de dichas partículas de un primer tipo (FP), en una primera dirección (X), durante un primer periodo de tiempo correspondiente al tiempo necesario para que dicha serie de puntos de equilibrio estable (SEP) se mueva en un espacio igual a un periodo espacial (CPIT);
- ii. detener el movimiento de dicho campo (F) durante un segundo periodo de tiempo (TW);
- iii. mover dicha serie de puntos de equilibrio estable (SEP) de dicho campo (F) a una segunda velocidad (VS)

comparable a la velocidad de movimiento (VSP) de dichas partículas de un segundo tipo (SP) en la dirección opuesta a dicha dirección (X), durante un tercer periodo de tiempo correspondiente al tiempo necesario para que dicha serie de puntos de equilibrio estable (SEP) se mueva en un espacio igual a un periodo espacial (CPIT);

5 para obtener un movimiento neto de solamente dichas partículas de un segundo tipo (SP) en la dirección opuesta a dicha dirección (X).

8. Un método como en la reivindicación 5, que comprende las etapas de:

10 i. mover dicha serie de puntos de equilibrio estable (SEP) de dicho campo (F) con una velocidad de movimiento (VF) comparable a la velocidad de movimiento (VFP) de dichas partículas de un primer tipo (FP), en una primera dirección (X), durante un periodo de tiempo correspondiente al tiempo necesario para que dicha serie de puntos de equilibrio estable (SEP) se mueva en un espacio igual a un periodo espacial (CPIT) menos una cantidad correspondiente al periodo de los electrodos (EPIT);

15 ii. detener el movimiento de dicho campo (F) durante un periodo de tiempo (TW);

iii. repetir las etapas anteriores i) y ii) durante un número de veces igual a un periodo espacial (CPIT) de dicho campo (F) dividido entre el periodo espacial de los electrodos (EPIT);

20 para obtener un movimiento neto de dichas partículas de un primer tipo (FP) en dicha primera dirección (X) y un movimiento neto de dichas partículas un segundo tipo (SP) en la dirección opuesta a dicha dirección (X).

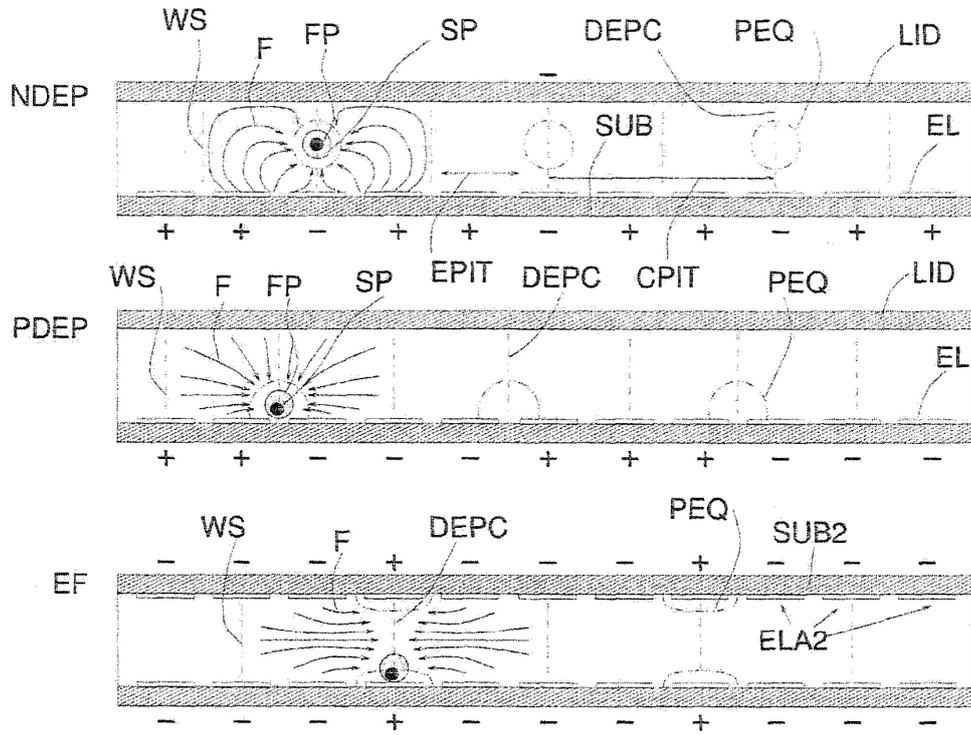


Fig 1

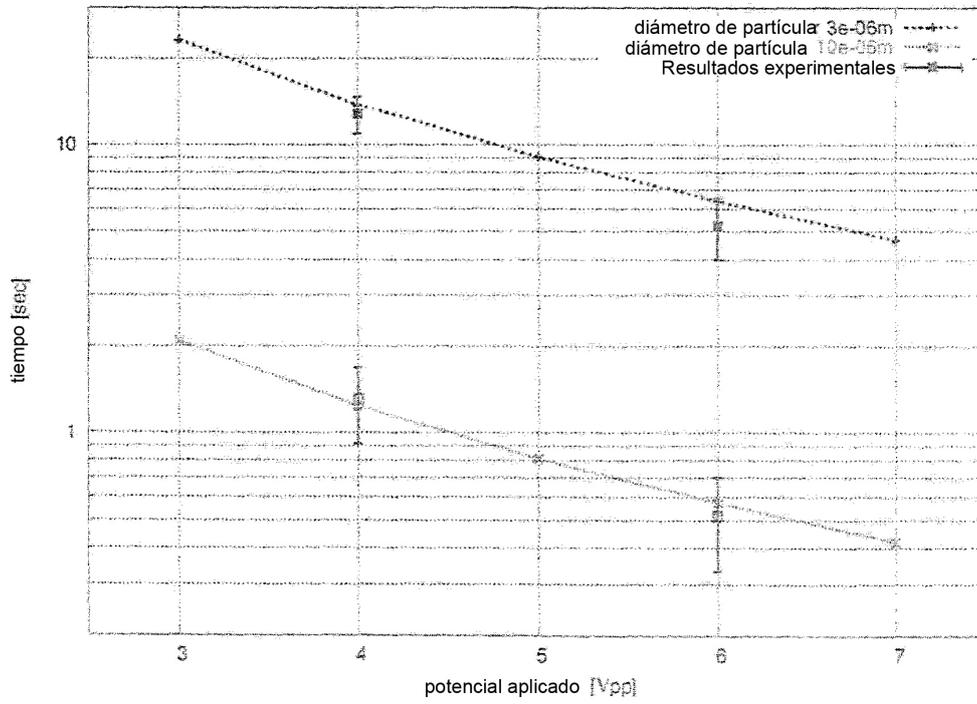


Fig 2

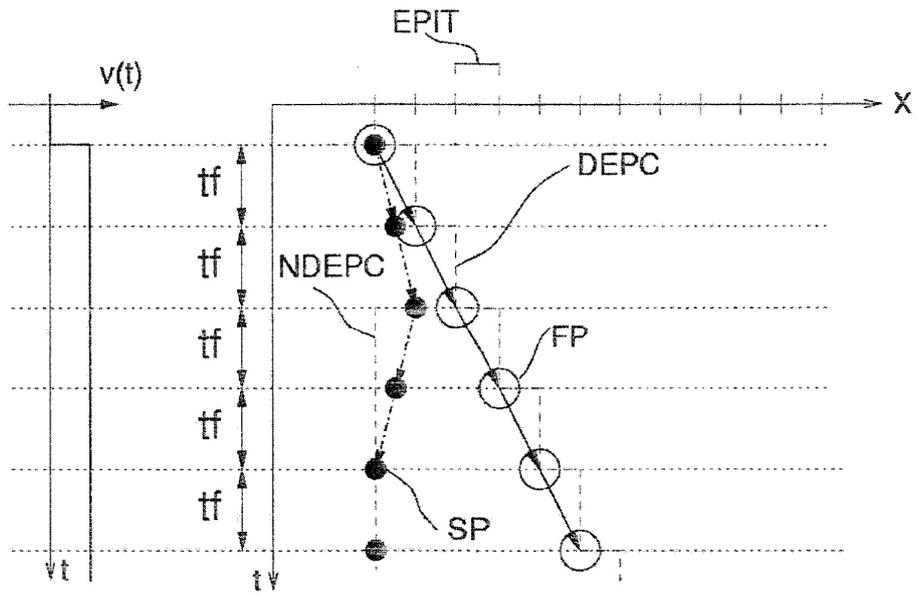


Fig 3

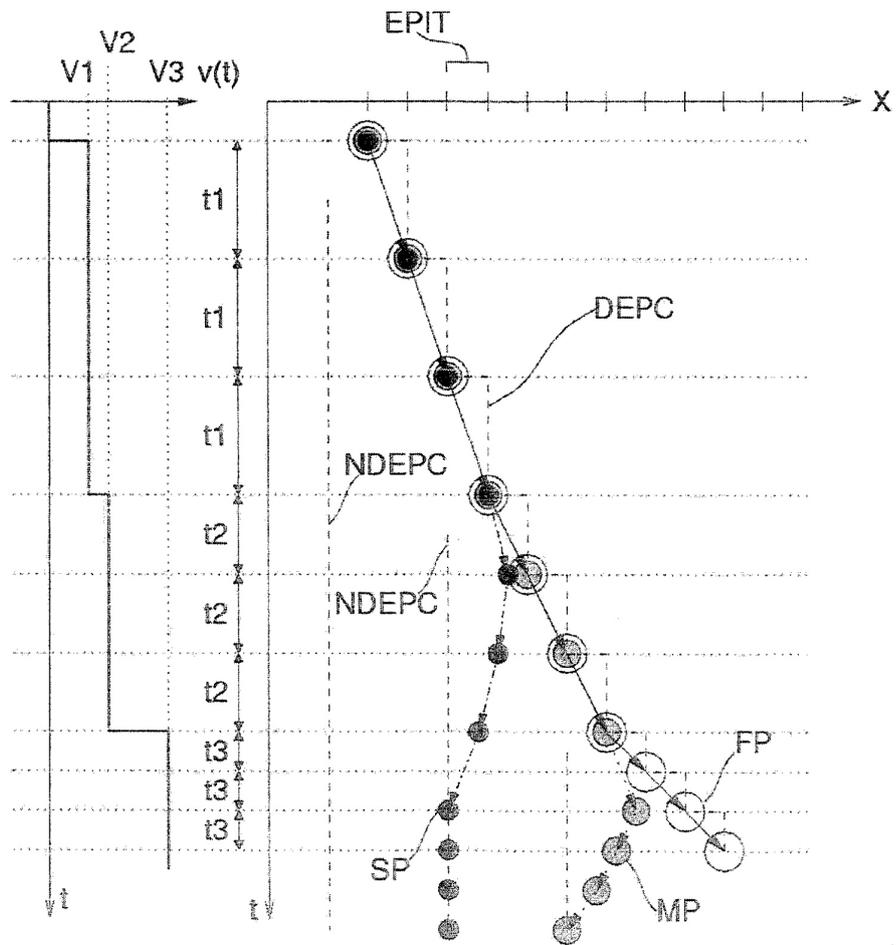


Fig 4

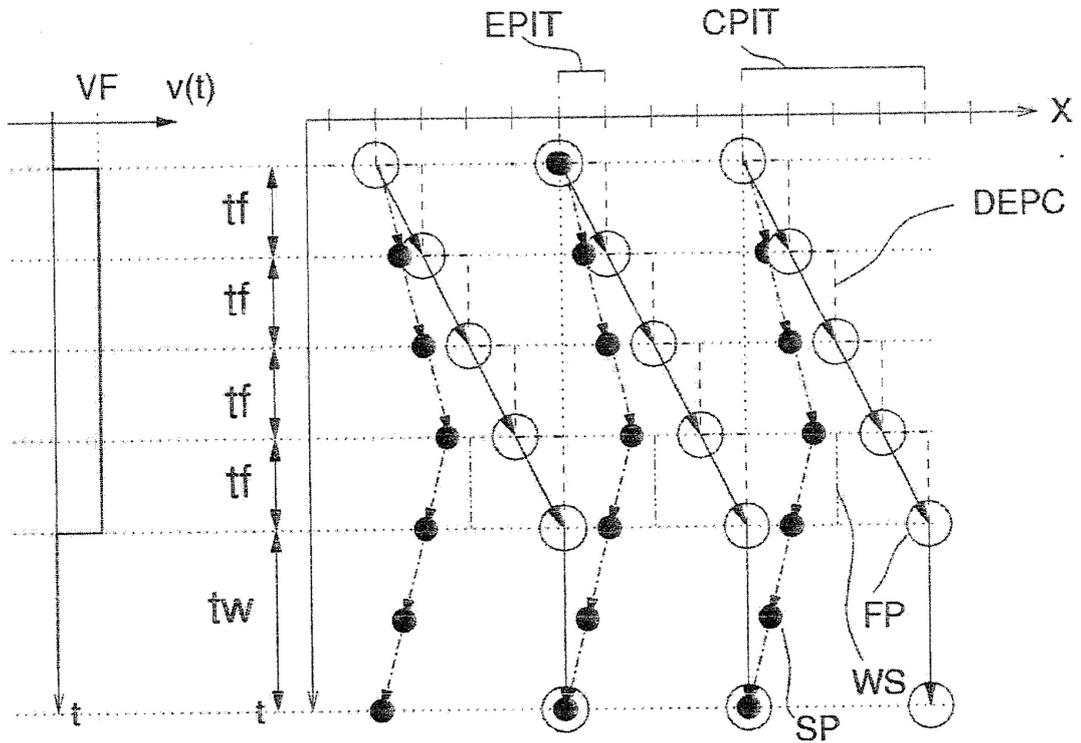


Fig 5

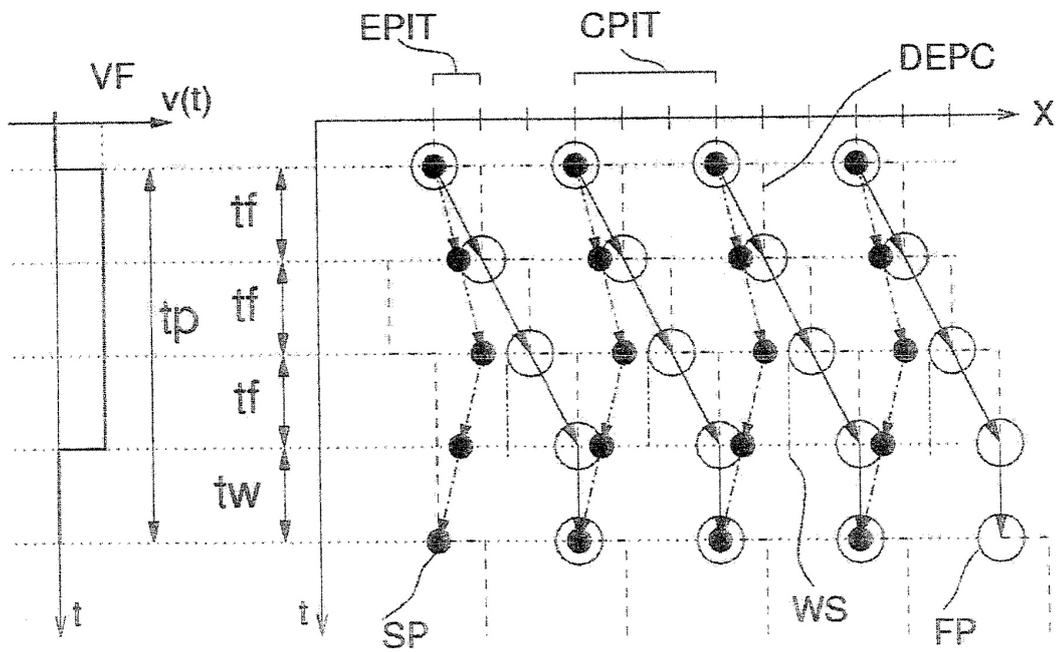


Fig 6

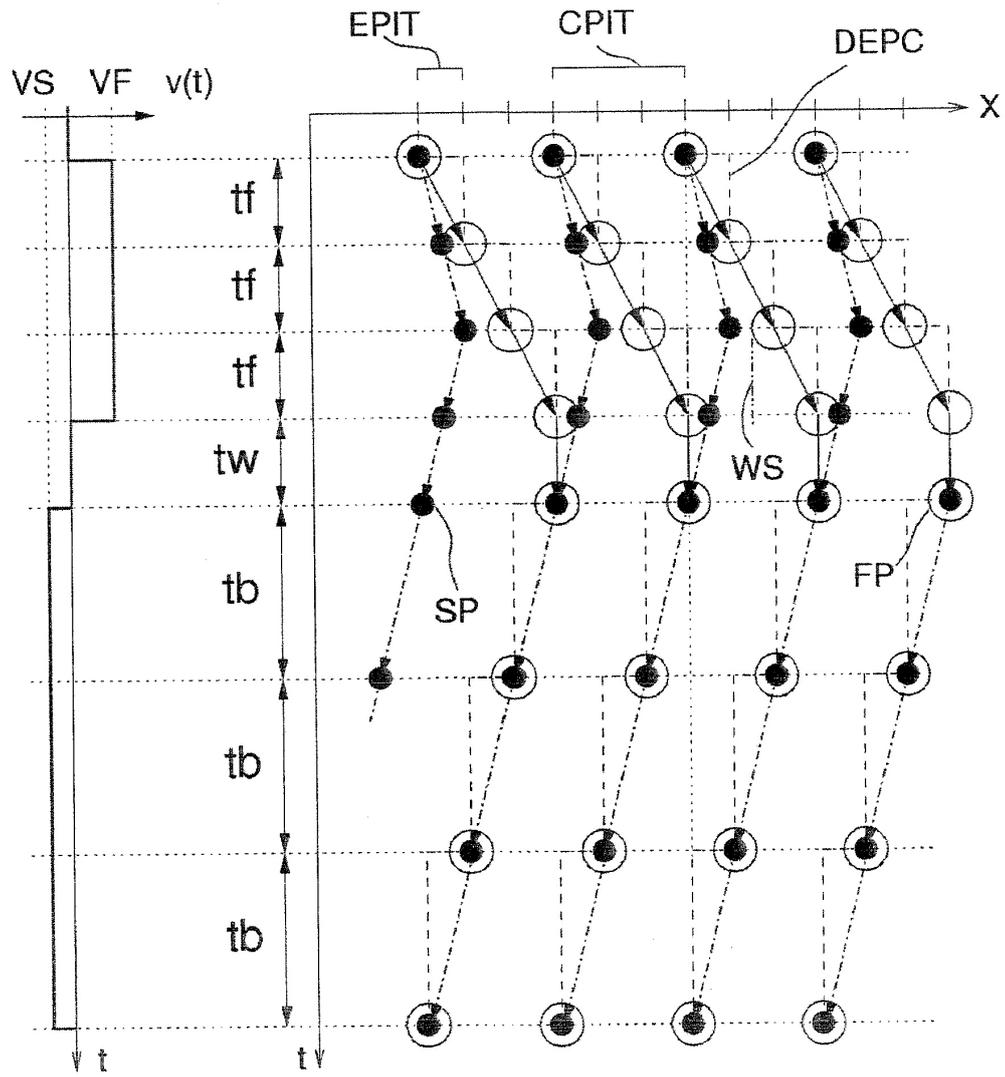


Fig 7

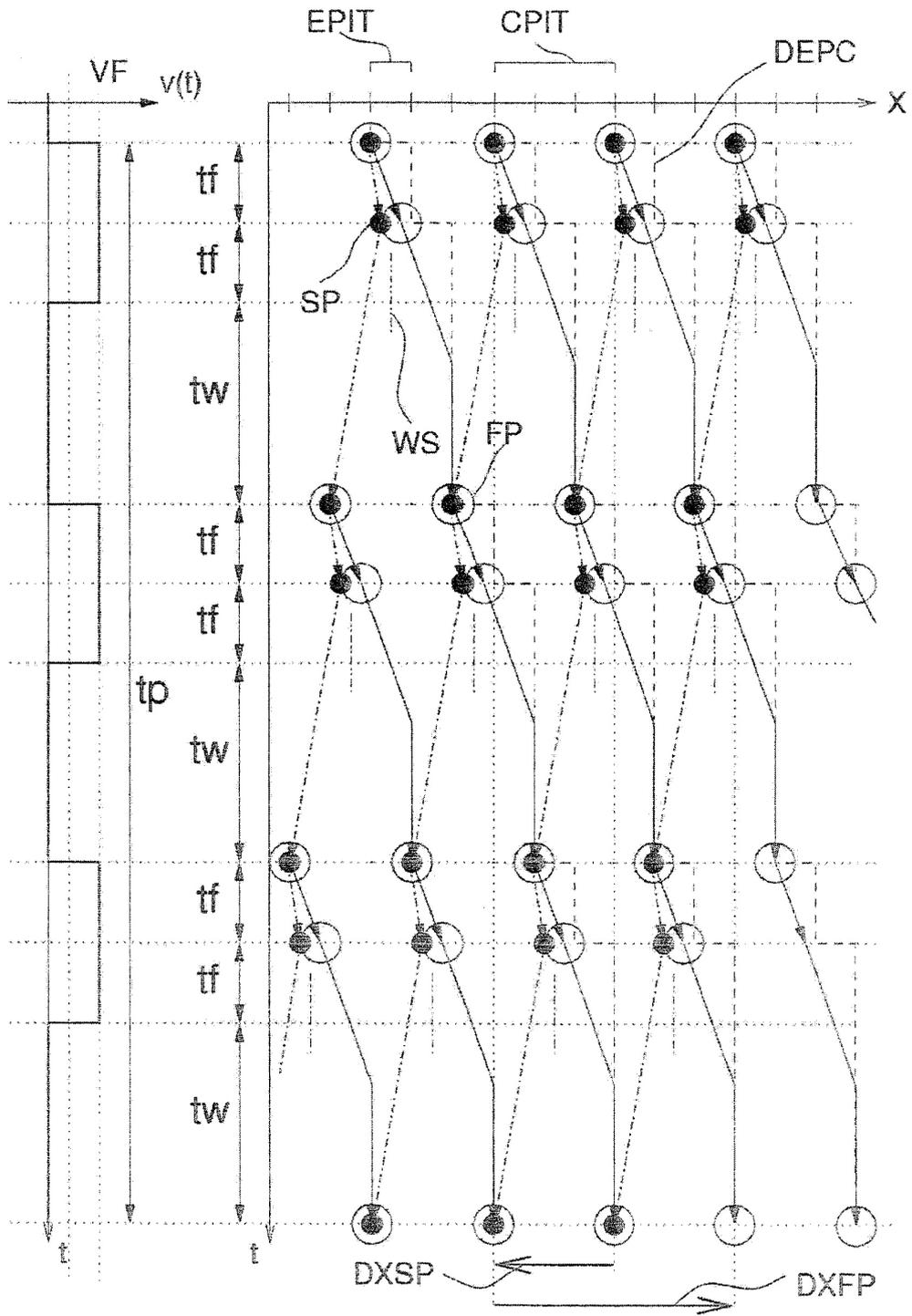


Fig 8

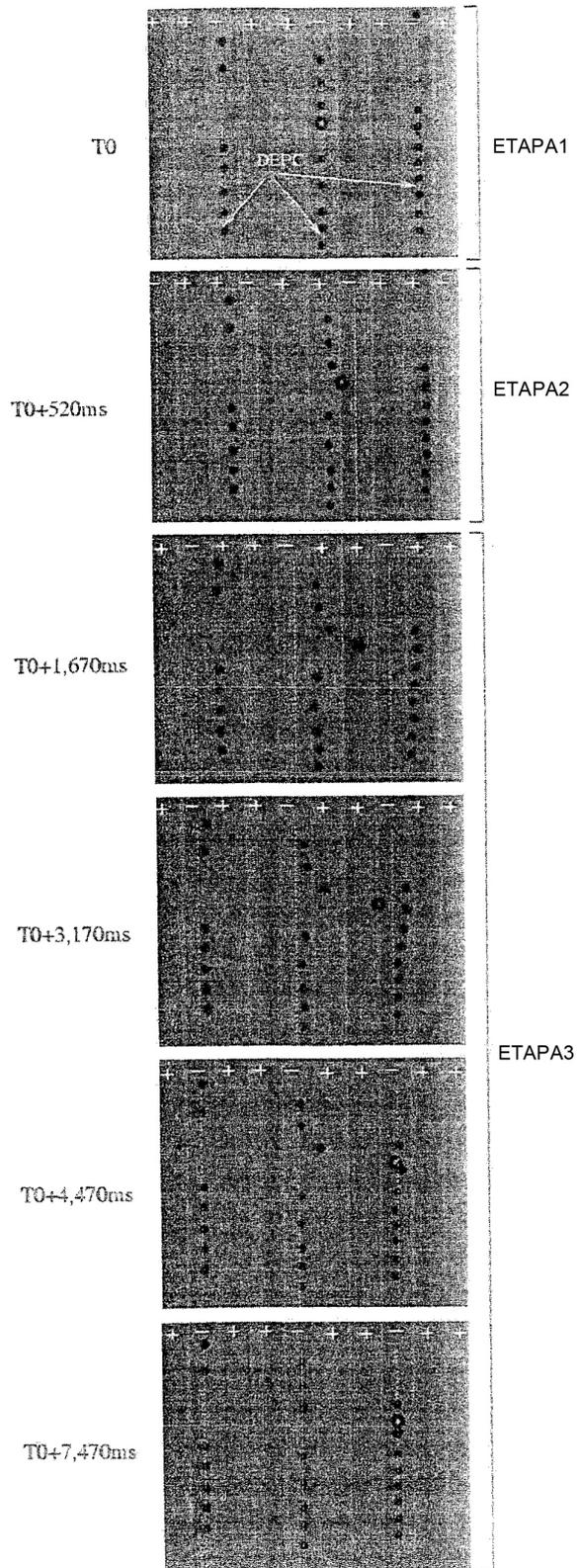


Fig 9

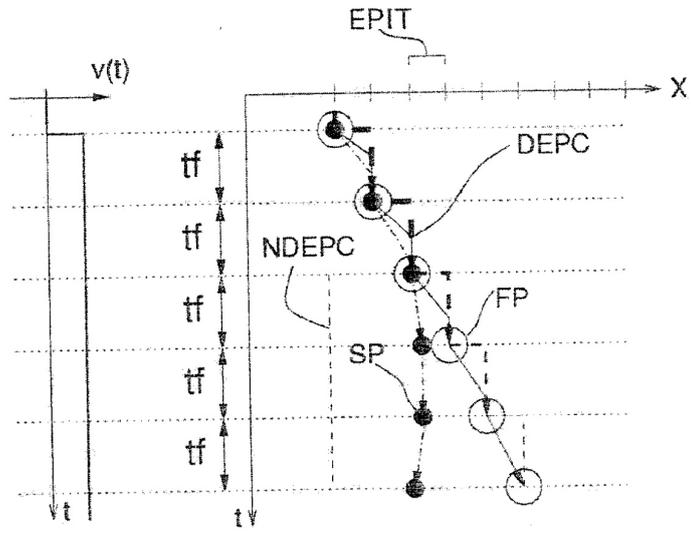


Fig 10

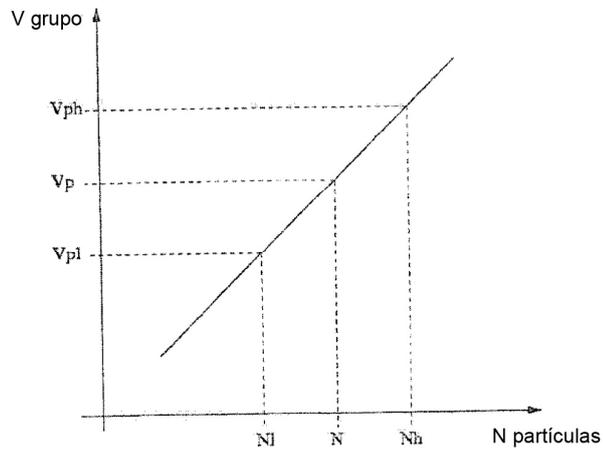


Fig 11

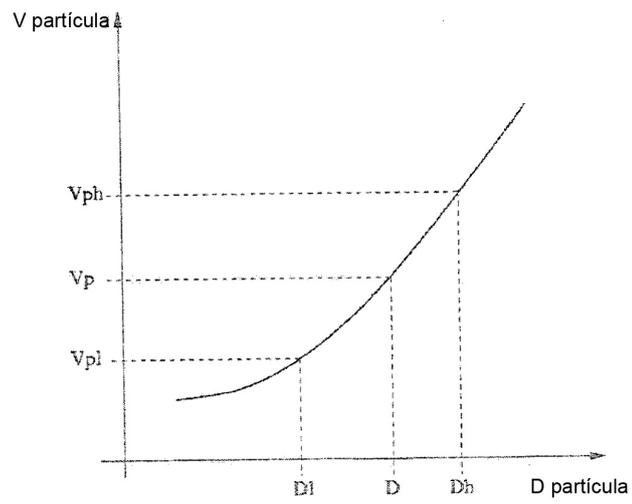


Fig 12

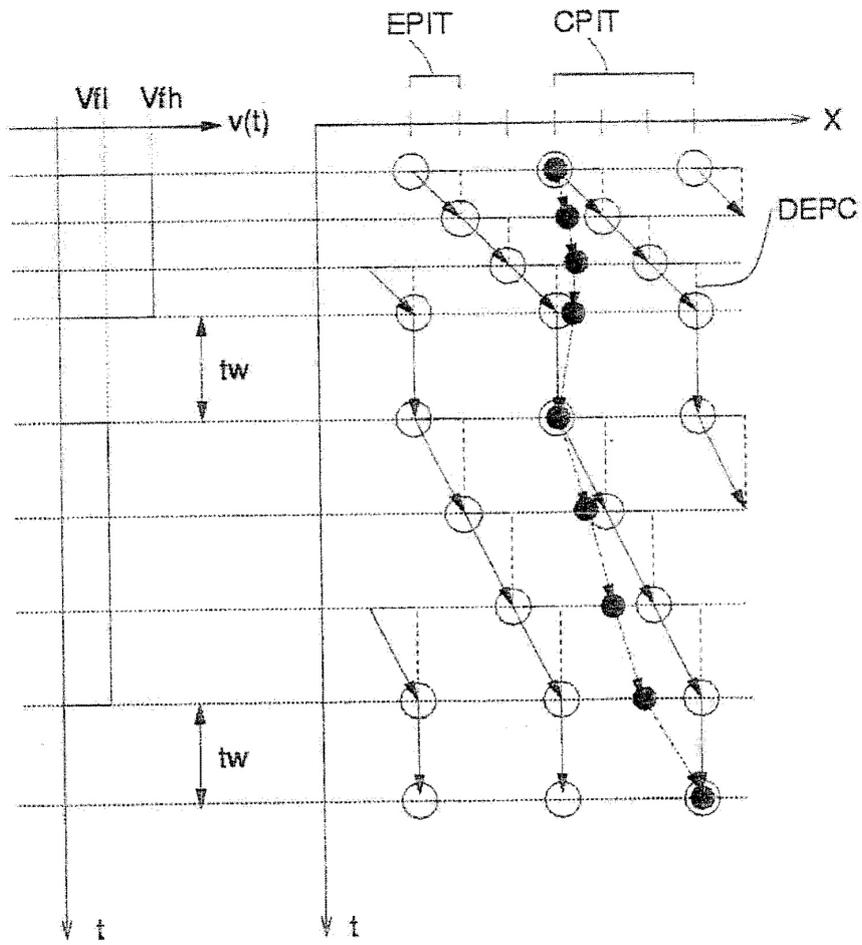


Fig 13