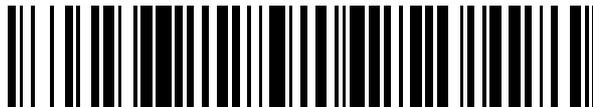


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 184**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

F04B 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2005 PCT/IB2005/052951**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2006 WO06027757**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2005 E 05782951 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 1802395**

54 Título: **Dispositivo microfluídico que utiliza un campo eléctrico colinear**

30 Prioridad:

09.09.2004 EP 04292173

14.12.2004 EP 04292995

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

23.09.2020

73 Titular/es:

INSTITUT CURIE (50.0%)

26, rue d'Ulm

75248 Paris Cedex 05, FR y

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE (50.0%)

72 Inventor/es:

VIOVY, JEAN-LOUIS;

CHABERT, MAX y

DORFMAN, KEVIN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 784 184 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

Dispositivo microfluídico que utiliza un campo eléctrico colinear

5 La presente invención se refiere a un método para la manipulación de paquetes en microcontenedores, en particular en microcanales.

Tal como aquí se utiliza, el término "paquete" se refiere a una materia compartimentalizada y puede referirse a un paquete de fluido, un paquete encapsulado y/o un paquete de sólido.

10 Un paquete de fluido se refiere a uno o más paquetes de líquidos o gases. Un paquete de fluido puede referirse a una gota o burbuja de un líquido o gas. Un paquete de fluido puede referirse a una gota de agua, una gota de reactivo o muestra, una gota de disolvente, una gota de disolución, una suspensión de partículas o suspensión celular, una gota de un producto intermedio, una gota de un producto de reacción final o una gota de cualquier material. Un ejemplo de un paquete de fluido es una gota de disolución acuosa en suspensión en aceite. En una forma de realización preferida, un paquete de fluido se refiere a una gota de agua o a una gota de disolución.

15 Un paquete encapsulado se refiere a un paquete encerrado por una capa de material. La superficie de un paquete encapsulado puede recubrirse con un reactivo, una muestra, una partícula o célula, un producto intermedio, un producto de reacción final o cualquier material. Un ejemplo de un paquete encapsulado es una vesícula lipídica que contiene una solución acuosa de reactivo en suspensión en agua.

20 Un paquete puede contener, por ejemplo, una vesícula u otra microcápsula de líquido o gas que puede contener un reactivo, una muestra, una partícula, una célula muerta o una célula viva, un producto intermedio, un producto de reacción final o cualquier material.

25 Un paquete de sólido se refiere a un material sólido, por ejemplo, material biológico, que puede contener o estar cubierto con un reactivo, una muestra, una partícula o célula, un producto intermedio, un producto de reacción final o cualquier material. Un ejemplo de un paquete de sólido es una microesfera de látex con reactivo ligado a su superficie en suspensión en una solución acuosa. Un paquete puede contener un cristal, un material policristalino o un material vítreo.

30 Los paquetes pueden hacerse variar, en gran medida, en tamaño y forma, y pueden tener una dimensión máxima entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 1 cm.

35 Los sistemas de gotas consisten en gotas con base de agua en aceite o en un disolvente fluorado, o gotas "oleosas" (no miscibles en agua) en un disolvente acuoso. El fluido implicado en el sistema de gotas de la invención puede ser cualquier clase de fluido, acuoso, orgánico, mineral, hidrofílico o hidrofóbico, incluyendo tampones con base de agua, fluidos biológicos, disolventes hidroorgánicos, líquidos hechos de moléculas con cadena principal de carbono-carbono, cadena de Silicio-Silicio (silicona), cadena heteroatómica (tal como, por ejemplo, glicol de polietileno), o líquidos iónicos. Los sistemas de gotas han recibido mucha atención en microfluídica como un método para obtener emulsiones precisas, tales como microrreactores discretos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la medición de cinética rápida y para el transporte libre de dispersión y la manipulación de partes alícuotas de muestra. Se han desarrollado esfuerzos considerables en los últimos años para crear y/o manipular microgotas. Algunos dispositivos utilizan fuerzas hidrofóbicas, al desplazar dichas gotas en un microcanal combinando algunas partes hidrofílicas y algunas hidrofóbicas. A modo de ejemplo, la patente de los Estados Unidos 6 130 098 da a conocer un método para desplazar microgotas, que comprende:

- 40 - proporcionar un canal de transporte de microgotas que tiene una o más zonas hidrofóbicas y en comunicación con una fuente de gas,
- 45 - introducir líquido en dicho canal en condiciones tales como que el líquido se detiene en una de las zonas hidrofóbicas,
- 50 - separar una microgota aumentando la presión aplicada por la fuente de gas para permitir que dicha gota se desplace sobre la zona hidrofóbica.

55 El presente método impone que diferentes gotas estén en contacto con la misma superficie sólida, y por lo tanto es propenso a la contaminación.

60 La manipulación de gotas en matrices planas de electrodos mediante electrohumectación también se ha vuelto muy popular, puesto que permite dirigir las gotas a diversas ubicaciones y a lo largo de recorridos complejos y programables. A modo de ejemplo, la patente de los Estados Unidos 6 294 063 da a conocer un aparato para manipular, de manera programable, una pluralidad de paquetes, siendo dichos paquetes opcionalmente gotas, comprendiendo dicho aparato una superficie de reacción configurada para proporcionar un lugar de interacción para dichos paquetes, un puerto de entrada, medios para generar fuerzas de manipulación sobre dichos paquetes, siendo

dichas fuerzas capaces de desplazar, de manera programable, dichos paquetes alrededor de dicha superficie de reacción a lo largo de recorridos elegidos arbitrariamente, y un sensor de posición.

La patente de los Estados Unidos 6 565 727 también da a conocer un dispositivo para manipular una gota de un líquido polar, que comprende una superficie superior e inferior, que definen entre ellas un espacio, comprendiendo dicha superficie superior una pluralidad de electrodos interdigitados, y dicha superficie inferior comprendiendo un contraelectrodo común. El dispositivo comprende, además, capas aislantes entre dichos electrodos y dicho espacio, y un líquido no polar colocado en el espacio. En este dispositivo, se puede mantener una gota en la parte superior de un primer electrodo sobre la superficie superior, aplicando un potencial entre dicho electrodo y el contraelectrodo en la superficie inferior, haciendo que la superficie superior se humedezca para la gota en la proximidad de dicho primer electrodo. A continuación, la gota se puede desplazar a un segundo electrodo en la superficie superior interdigitada con dicho primer electrodo, suprimiendo la diferencia de potencial entre el primer electrodo y el contraelectrodo, y aplicando una diferencia de potencial entre el segundo electrodo y el contraelectrodo para hacer dicho segundo electrodo humectante al fluido.

La electrohumectación también se puede utilizar para mezclar dos gotas diferentes, tal como se describe, p.ej., en M. Washizu, IEEE Trans. Ind. Appl., 34, 732-737 (1998). La mezcla de gotas que contienen, p.ej., dos reactivos, o una muestra y un reactivo, es una etapa tecnológica clave para el desarrollo de sistemas microfluídicos integrados o "laboratorio en chips".

El formato de una matriz plana de electrodos requeridos por la electrohumectación, sin embargo, tiene graves inconvenientes. La fabricación del conjunto matricial de electrodos es compleja, y se hace extremadamente costosa y técnicamente exigente para superficies que exceden unos pocos centímetros cuadrados. Por lo tanto, transportar gotas a grandes distancias, p. ej., a más de 10 cm, no es práctico. Además, para las gotas de líquido, la superficie debe mantenerse horizontal y relativamente libre de vibraciones, para evitar el movimiento no deseado de las gotas bajo la acción de la gravedad o de las ondas acústicas. La manipulación de gotas en formato planar, también puede estar limitada por la evaporación de gotas, siendo este último un importante obstáculo en las aplicaciones cuantitativas de bioquímica, puesto que los rendimientos de la reacción son muy sensibles a la concentración. La electrohumectación puede introducir aún más contaminación superficial. Otra limitación es que la electrohumectación solamente puede funcionar con líquidos, por lo que no puede utilizarse para transportar objetos sólidos.

La dielectroforesis es otra forma de transportar y mezclar gotas u objetos sólidos tales como células o partículas de látex. A modo de ejemplo, Schwartz et al. en Lab Chip, 4, 11-17 (2004) da a conocer un procesador de fluidos programable, en donde las gotas se pueden desplazar y mezclar en la parte superior de un conjunto matricial de electrodos, proporcionando energía secuencialmente a los electrodos en la matriz. Sin embargo, el presente método también requiere una compleja matriz de electrodos sobre una superficie planar y, por lo tanto, comparte muchos de los inconvenientes de la electrohumectación. En otro ejemplo, Velev et al., Nature, 426, 515-516 (2003) da a conocer un proceso para desplazar y mezclar gotas que flotan en una capa de aceite fluorado, donde el aceite está en contacto con un patrón de electrodos. Esto elimina los problemas de contaminación inherentes a la electrohumectación, pero aún requiere la fabricación de una matriz compleja de electrodos.

El transporte y la mezcla de gotas en un microcanal alargado, o en una red de microcanales conectados es más resistente a los problemas anteriores. A modo de ejemplo, evita la evaporación y permite el transporte a largas distancias mediante la simple movilización hidrodinámica de un fluido portador que rodea las gotas. De este modo, las gotas pueden transportarse en capilares de varios metros de longitud y utilizarse como microrreactores, tal como se describe, p.ej., en Curcio y Roeraade, Anal. Chem., 75, 1-7 (2003). Cuando la interacción con las paredes está bien controlada, todas las gotas se desplazan a la misma velocidad y se logran trenes muy estables. Sin embargo, los sistemas de este tipo sufren contaminación entre las gotas, lo que se ha atribuido a la formación de pequeñas gotas de satélite en el flujo. Park y col. Anal. Chem 2003, 75, 6029-6033, ha propuesto un sistema en donde numerosos tapones de muestras acuosas están separados por tapones de aire. Sin embargo, los tratamientos de pared no son suficientes para eliminar por completo la contaminación, por lo que a veces es necesario incluir una gota de "lavado" entre las muestras. Además, las burbujas en la corriente pueden introducir irregularidades en el historial térmico de las gotas, lo que hace que esta técnica sea menos atractiva para aplicaciones cuantitativas.

Asimismo, se propuso manipular partículas sólidas o células en microcanales mediante dielectroforesis. La dielectroforesis utiliza una fuerza ejercida sobre una partícula con una constante dieléctrica diferente de la del medio circundante en un gradiente de campo eléctrico. Hasta la fecha se utilizaron diferentes tipos de disposiciones para la aplicación de dielectroforesis en microcanales. En una primera disposición, una serie de electrodos interdigitados estrechamente espaciados crea localmente líneas de gradiente de alto campo en donde las partículas son atraídas. De manera opcional, estas líneas se pueden desplazar en el tiempo energizando de manera alternativa diferentes series de electrodos, siendo denominado dicho método como "dielectroforesis de onda viajera". A modo de ejemplo, Schnelle et al., Electrophoresis, 21, 66-73 (2000) da a conocer un método para clasificar partículas, en donde son desviadas por la dielectroforesis de onda viajera entre una multiplicidad de electrodos en una disposición interdigitada, y energizadas de manera secuencial con una señal eléctrica de corriente alterna de cuatro fases. Mediante el uso de pares de electrodos de diferentes formas uno frente al otro a través del microcanal, y aplicando una diferencia de potencial entre ellos, también es posible crear diferentes tipos de trampas dielectroforéticas, jaulas o electrodos

deflectores, tal como se describe, p.ej. en Durr et al., *Electrophoresis*, 24, 722-731 (2003).

Estos dispositivos dielectroforéticos presentan algunas ventajas sobre los sistemas planares. En particular, son más resistentes a la inclinación o a la vibración. Sin embargo, todavía requieren una micro fabricación compleja y su fabricación es costosa.

Otro obstáculo clave en el desarrollo de sistemas de microcanales de gotas, especialmente para aplicaciones de microrreactores, es la mezcla de muestras o reactivos de diferentes fuentes. Para ello, se necesita efectuar la coalescencia de dos gotas, pero las fuerzas de Laplace y las fuerzas hidrodinámicas tienden a dificultar esta fusión. Al llegar de manera simultánea a una intersección en T, una caída simplemente sigue a la segunda hacia la T sin coalescencia. La coalescencia puede ser forzada por contacto cargando las gotas, pero esto podría ser una fuente importante de contaminación en PCR y otros sistemas biológicos. Una vez que se introduce en un canal, una gota más pequeña que sigue a una más grande, puede eventualmente entrar en coalescencia con ella, puesto que la gota más pequeña se desplaza con una velocidad media más alta. Sin embargo, esta no es una estrategia racional en microfluídica, puesto que el drenaje de la película entre las gotas es muy lento, lo que lleva a distancias de coalescencia entre 30-100 diámetros de tubo (Olbricht y Kung, *J. Colloid Interface Sci.*, 120, 229-244 (1987)). Además, bajo ciertas condiciones (tamaños de gota relativos, viscosidades, etc.) no se logra ninguna coalescencia, y el tiempo o la posición de coalescencia no son muy reproducibles.

Los documentos WO 2004/091763 y WO 2005/012251 son técnicas anteriores de conformidad con el artículo 54 (3) EPC y describen métodos de manipulación de gotas.

Los documentos US 2004/0055891 y H. Ren, RB Fair y MG Pollack, *Dispensación automatizada de gotas en chip con control de volumen mediante accionamiento electrohumectante y medición de capacitancia*, *Sens. Actuators, B*, 2004, 98, 319-327 dan a conocer técnicas de electrohumectación.

Los documentos US 2003/127329 y Erickson, David y Li, Dan-Di. (2003), *Análisis de flujos electroosmóticos de corriente alterna en un microcanal rectangular*. *Langmuir* 19. 10.1021/la027035 describen un aparato microfluídico en donde las gotas se desplazan por flujo electroosmótico. En consecuencia, existe una gran necesidad de un dispositivo y método que proporcione manipulación de gotas reproducible, libre de contaminación, en particular coalescencia, en microcanales o sistemas microfluídicos cerrados.

Un objeto de la presente invención, entre otros, es proporcionar dicho dispositivo y método.

La presente invención se refiere, según uno de sus aspectos inventivos, a un método para deformar, en particular dividir, al menos un paquete, o desplazar al menos dos paquetes entre sí, según la reivindicación 1.

Dicho de otro modo, la manipulación de los paquetes con el método según la presente invención puede llevarse a cabo generando un campo eléctrico apropiado, o modificando la tensión superficial de un paquete de líquido, o combinando ambas técnicas.

La tensión interfacial puede modificarse, preferiblemente disminuirse, en un factor de al menos 20%, y más preferiblemente en un 50%.

Cuando se introducen dos paquetes en la parte del microcanal en donde se aplica el campo eléctrico para provocar el colapso de dos paquetes, el campo eléctrico en los paquetes crea dipolos, estando dichos dipolos orientados prácticamente a lo largo del eje del microcanal de modo que los paquetes se atraen entre sí y se colapsan.

La expresión "prácticamente colineal" significa que el promedio de la dirección del campo eléctrico forma con el eje del microcanal un ángulo menor de 45°, por ejemplo, menor de 30°, preferiblemente menor de 20°, y más preferiblemente menor de 10° o 5°.

La invención puede utilizarse para inducir el colapso de dos paquetes y, por ejemplo, la coalescencia de dos gotas dentro del microcanal.

El fenómeno físico general denominado "electrocoalescencia" se da a conocer en P. Atten, *J. Electrostat.* 30, 259 (1993). Como fuerzas electroforéticas, y en contraste con la dielectroforesis, la electrocoalescencia no requiere un gradiente de campo.

Cuando el paquete es una célula, o contiene varias células, la invención puede utilizarse para inducir la electroporación de dicha célula o la multiplicidad de células.

La invención también puede utilizarse para dividir un paquete en varios paquetes de menor tamaño y, por ejemplo, para extraer desde una gota una o varias gotas de menor tamaño.

Un microcontenedor según la invención puede tener cualquier tamaño. Preferiblemente, tiene al menos una dimensión

- más pequeña que un milímetro. En una forma de realización, dicho microcontenedor es un microcapilar con un diámetro menor de 1 mm. A modo de ejemplo, al menos una dimensión en la sección transversal de dicho capilar está comprendida preferiblemente entre 100 μm y 1 mm. En una forma de realización, al menos una dimensión de dicho capilar está comprendida entre aproximadamente 10 nm y 100 μm , preferiblemente entre 1 μm y 100 μm .
- 5 En otra forma de realización, dicho microcontenedor es un microcanal microfabricado con un espesor menor de 1 mm. En algunas formas de realización, el espesor de dicho microcanal está comprendido preferiblemente entre aproximadamente 100 μm y 1 mm. El espesor de dicho microcanal puede estar comprendido entre aproximadamente 10 nm y 100 μm , preferiblemente entre 1 μm y 100 μm .
- 10 En la presente invención, "microcontenedor", en particular "microcanal", significa un volumen al menos parcialmente encerrado por superficies sólidas, dicho volumen es pequeño. Preferiblemente, un microcontenedor, en particular un microcanal, en la invención tiene una relación superficie/volumen prácticamente mayor que 1 mm^{-1} , preferiblemente mayor que 4 mm^{-1} , por ejemplo, mayor que 10 mm^{-1} , posiblemente mayor que 1 μm^{-1} . Los microcanales también abarcan nanocanales.
- 15 En una forma de realización, el microcanal es preferiblemente alargado, es decir, la dimensión a lo largo de su eje es mayor en un factor de 3, preferiblemente en un factor de 10, por ejemplo, en un factor de 100 o 1000, que a lo largo de cualquier otra dirección perpendicular a dicho eje.
- 20 El eje del microcanal puede ser rectilíneo o no.
- El microcanal puede tener una sección transversal que es constante o no. La sección puede ser, por ejemplo, circular, elipsoidal, rectangular, cuadrada o con forma semiovoide.
- 25 En la presente invención, "espesor" significa la distancia interior más pequeña en sección transversal entre dos lados opuestos del microcanal. A modo de ejemplo, para un microcanal cilíndrico que tiene una sección transversal circular, el espesor es el diámetro. Para un microcanal en forma de hendidura que tiene una sección transversal rectangular, el espesor es la longitud del lado pequeño del rectángulo.
- 30 El espesor del microcanal puede tomar cualquier valor entre unos pocos nm y unos pocos mm. Preferiblemente, el espesor está comprendido entre 1 μm y 1 mm. Aun preferiblemente, la longitud del microcanal a lo largo de su eje, puede elegirse para que sea al menos 10 veces mayor que el espesor. El microcanal puede tener una longitud elegida entre 10 mm y varios metros, por ejemplo, entre 1 cm y 50 cm.
- 35 Preferentemente, la parte del microcanal, en donde el campo eléctrico es prácticamente colineal con respecto al eje del microcanal, tiene una longitud a lo largo de dicho eje al menos tan grande como el espesor del microcanal, y menor que la longitud total del microcanal. En una forma de realización preferida de la invención, la longitud de dicha parte del microcanal está comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 veces el espesor de dicha parte, y preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 veces el espesor de dicha parte.
- 40 El microcanal puede ser rígido o flexible y comprende, por ejemplo, un tubo realizado a partir de un material flexible no conductor de electricidad.
- El microcontenedor, en particular el microcanal, puede obtenerse a partir de al menos un material seleccionado entre:
- 45 vidrio de sílice fundido, PDMS (polidimetilsiloxano), PMMA (polimetilmetacrilato), cualquier tipo de elastómero o plástico, tal como por ejemplo, polietileno, poliimida, epoxi, Teflón®, Parileno®, poliestireno, tereftalato de polietileno, fluoropolímero, poliéster, copolímero de olefina cíclica, óxido no conductor tal como, por ejemplo, vidrio, dióxido de silicio, diamante, cerámica no conductora, una silicona, un elastómero, un material vítreo, un material mineral, una cerámica, un polímero, un polímero termoplástico, una resina termocurable, una resina fotocurable, un copolímero.
- 50 En una forma de realización a modo de ejemplo de la invención, el microcanal tiene al menos un puerto de entrada, y/o al menos un puerto de salida. De manera opcional, al menos uno de dichos puertos se puede conectar a uno o varios depósitos, a una o varias bombas, a uno o varios detectores o sensores o a uno o varios dispositivos de muestreo.
- 55 El microcanal puede formar parte de una red de microcanales conectados.
- En la invención, dicho conjunto de electrodos está aislado eléctricamente de una superficie interior del microcanal, por ejemplo, por un material aislante. El material aislante puede tener un espesor de al menos 1 nm, por ejemplo, al menos
- 60 10 nm, preferiblemente al menos 100 nm, lo más preferiblemente de al menos 1 μm , por ejemplo, hasta varias decenas o centenares de μm . En condiciones normales, se pueden preferir capas aislantes más gruesas para microcanales más grandes. Este material aislante puede obtenerse de, por ejemplo, material polimérico, p.ej. polietileno, poliimida, epoxi, Teflon®, Parylene®, PMMA, poliestireno, tereftalato de polietileno, fluoropolímero, poliéster, copolímero de olefina cíclica, PDMS, óxido no conductor tal como, por ejemplo, vidrio, dióxido de silicio, diamante, cerámica no
- 65 conductora.

- 5 El conjunto de electrodos comprende al menos dos electrodos espaciados axialmente a lo largo del eje del microcanal por una distancia lo suficientemente larga como para que el campo eléctrico entre los electrodos sea prácticamente colineal al eje del microcanal. Cada electrodo puede ser simétrico con respecto al eje del microcanal. De manera ventajosa, al menos uno de dichos electrodos comprende al menos dos partes equipotenciales enfrentadas a través del microcanal. Al menos uno de dichos electrodos puede ser monolítico y tener, por ejemplo, una superficie cilíndrica que rodea el microcanal. En una variante, al menos uno de dichos electrodos es compuesto, es decir, está realizado de una pluralidad de piezas, que comprende, por ejemplo, al menos dos placas equipotenciales prácticamente paralelas que intercalan el microcanal. Los electrodos también pueden tener una forma diferente a las descritas con anterioridad.
- 10 Lo que antecede es diferente de la técnica anterior como se da a conocer en la solicitud de patente FR 2 794 039 o en Paik et al., Lab Chip, 3, 28-33 (2003) en donde la manipulación de las gotas se obtiene por una configuración opuesta, es decir aplicando una diferencia de potencial entre dos electrodos planos enfrentados a través de la cámara en donde está contenida la gota a manipular.
- 15 Preferiblemente, los electrodos están separados por un espacio que tiene una longitud que es mayor que el espesor del microcanal, preferiblemente mayor que el doble del espesor.
- 20 La unidad de generador comprende de manera ventajosa al menos uno de entre un generador de corriente y un generador de tensión, configurado para crear una diferencia de potencial entre dichos dos electrodos, preferiblemente un potencial alterno.
- 25 De manera ventajosa, el conjunto de electrodos está configurado de modo que en al menos una sección transversal del microcanal la amplitud del campo eléctrico varía menos que un factor 10, preferiblemente menos que un factor 5, mejor menos que un factor 2, y preferiblemente es prácticamente uniforme, en particular en el espacio entre los electrodos.
- 30 El campo eléctrico generado por la unidad de generador a través del conjunto de electrodos puede tener cualquier perfil temporal, por ejemplo, continuo, variable o alterno (CA), o una combinación de dichos perfiles temporales. A modo de ejemplo, el campo eléctrico puede ser un campo de corriente alterna CA con frecuencia variable o amplitud de media cuadrática (RMS), o una superposición de componentes continuos y de corriente alterna CA.
- 35 Por "campo AC", nos referimos a cualquier campo periódico en el tiempo y con un promedio de tiempo cero. Ejemplos no limitativos de campos AC, de conformidad con la invención, son los campos AC sinusoidales, cuadrados o en diente de sierra.
- 40 La unidad de generador es preferiblemente capaz de generar un campo eléctrico de corriente alterna con una frecuencia que varía de aproximadamente 0,01 Hz a aproximadamente 1 GHz, preferiblemente de aproximadamente 1 Hz a aproximadamente 10 MHz.
- 45 La coalescencia de las gotas se consigue de manera eficiente, por ejemplo, con frecuencias entre 100 Hz y 10 kHz. La división en partes alícuotas de al menos una gota se consigue preferiblemente a frecuencias inferiores a 50 Hz.
- 50 La unidad de generador puede configurarse para suministrar una tensión RMS que oscila entre 1 V y 30 kV, preferiblemente entre 60 V y 2 kV, dependiendo de la naturaleza del paquete, del fluido que rodea el paquete, del microcanal y del tamaño del dispositivo. La tensión puede aumentar a medida que aumenta el tamaño del dispositivo. El campo eléctrico RMS dentro del microcanal en el espacio entre los electrodos puede variar, por ejemplo, entre 100 V/cm y 100 kV/cm, y preferiblemente entre 500 V/cm y 20 kV/cm.
- 55 La unidad de generador puede configurarse para proporcionar una tensión con al menos una de entre la amplitud y la frecuencia es variable en relación con el tiempo. A modo de ejemplo, la amplitud y/o la frecuencia del campo eléctrico pueden modificarse cuando dos paquetes entran en contacto próximo.
- De manera ventajosa, el conjunto de electrodos está alojado en un soporte, teniendo este último dos elementos de soporte separados ensamblados conjuntamente mediante un elemento de fijación, incluyendo cada elemento de soporte un electrodo del conjunto de electrodos. El soporte puede comprender al menos un orificio para recibir el microcanal.
- 60 Cuando el microcanal está conectado a un canal lateral, dicho canal lateral puede tener una sección transversal con dimensiones comparables a las del microcanal. Preferiblemente, la sección transversal del canal lateral es más pequeña que la del microcanal. En una variante, la sección transversal del canal lateral es mayor que la del microcanal.
- 65 El sistema de suministro asociado con dicho canal lateral puede comprender medios de control de presión o medios de control de flujo.
- Preferentemente, dicho canal lateral y dicho sistema de suministro están configurados para suministrar en el

microcanal una solución que contiene un tensioactivo.

El término "tensioactivo" significa cualquier especie, molécula o combinación de moléculas capaces de modificar la tensión interfacial entre dos fluidos. Un tensioactivo puede ser, por ejemplo, una especie tensioactiva o anfifílica.

El tensioactivo se puede elegir para favorecer la formación de emulsiones de aceite en agua.

Dichos tensioactivos suelen ser tensioactivos con un alto HLB (equilibrio hidrofílico/lipofílico), por ejemplo, con valores de HLB superiores a 15. Ejemplos no limitantes de dichos tensioactivos son el sulfato de dodecilo de sodio (SDS), ácido oleico y CTAB.

Se mencionan numerosos tensioactivos capaces de reducir la tensión interfacial entre una fase oleosa y una fase acuosa, o para favorecer la coalescencia de gotas, p.ej., en *Emulsiones, un método fundamental y práctico*, J. S. Sjöblom Ed, Kluwer, Dordrecht (1992), o en P. Becher, *Emulsiones, Teoría y práctica*, 2ª Edición, R.E. Pub Krieger Co, Malabar, Fl (1985).

En una forma de realización a modo de ejemplo de la invención, para unir o dividir dos gotas, el dispositivo que comprende un primer canal lateral conectado al sistema de suministro, el microcanal puede estar conectado a un segundo canal lateral, preferiblemente conectado en relación o próximo del primer canal lateral y configurado para recoger paquetes formados por la fusión o división de paquetes originales.

El microcanal puede obtenerse a partir de una amplia variedad de materiales homogéneos o compuestos. A diferencia de la técnica anterior descrita en la patente US 6 294 063, en donde los paquetes se manipulan sobre una superficie de reacción configurada para proporcionar puntos de interacción para dichos paquetes, la pared del microcanal según la presente invención puede estar realizada de un material o tratarse con un material, lo que reduce el riesgo de interacción de los paquetes con la pared del microcanal en presencia del fluido integrante. Es posible que no haya interacción química en absoluto entre los paquetes y el microcanal.

En una forma de realización a modo de ejemplo, siendo el paquete una gota con base de agua, la tensión interfacial entre la gota y la pared del microcanal se hace mayor que la tensión interfacial entre la gota y el fluido circundante, tratando la pared del microcanal y/o incluyendo la integrante en la gota y/o en los aditivos de fluidos.

Se pueden utilizar numerosas formas para aumentar la tensión superficial entre un líquido con base de agua y una superficie. Como ejemplo, se puede elegir una superficie naturalmente hidrofóbica, tal como fluorocarbono o polietileno. También se puede tratar la superficie con materiales hidrofóbicos tales como Teflon® AF, silano o fluorosilano.

La tensión superficial entre agua y los fluidos con base de aceite hidrogenado puede disminuirse por la presencia de moléculas tensioactivas. Numerosas moléculas de superficie activa son conocidas en la técnica, y a continuación enumeramos solamente algunas como ejemplos: tensioactivos como Plurionics® y Symperionics®, Triton®, Tween®, Span® 80, Tergitol®, sulfato de dodecilo sódico (SDS), ácido oleico, metilcelulosa, hidroxietil e hidroxipropilcelulosa, o Coatex®. Si el fluido está fluorado, entonces los tensioactivos fluorados, tales como 1H, 1H, 2H, 2H perfluorodecan-1-ol o 1H, 1H, 2H, 2H perfluorooctan-1-ol, son particularmente adecuados.

Los fluidos fluorados inmiscibles en agua pueden comprender al menos uno de los siguientes elementos: alcanos, alcenos o alcinos fluorados parcial o totalmente, por ejemplo, perfluoroalcanos tales como perfluorodecalina. En una forma de realización de la invención, el fluido inmiscible en agua es una mezcla de moléculas fluoradas, tales como los disolventes fluorados de la familia "Freon", o el fluorosurfactante FC, tales como FC40 o FC75 (comercializado por 3M). Preferiblemente, ningún compuesto de un peso molecular dado en dicha mezcla representa más del 75% p/p (peso en peso) de la mezcla.

En una forma de realización a modo de ejemplo de la invención, el microcanal se rellena con un fluido que rodea al menos un paquete, dicho fluido puede ser cualquier líquido o fluido gaseoso, siempre que no sea miscible en el paquete o con la pared del microcanal.

El fluido que rodea el paquete puede ser un líquido, por ejemplo, un líquido orgánico o inorgánico inmiscible en agua.

El fluido puede ser un líquido o gas fluorado, y la gota puede ser un líquido orgánico o hidroorgánico, que de manera opcional contiene especies.

En una forma de realización a modo de ejemplo de la invención, el paquete y el fluido circundante tienen diferentes conductividades y/o diferentes constantes dieléctricas. A modo de ejemplo, el paquete puede tener una conductividad más alta que la conductividad del fluido circundante.

En una forma de realización a modo de ejemplo de la invención, el paquete es una gota de un primer líquido en suspensión en un segundo líquido inmiscible, siendo dicho primer líquido más conductor de la electricidad que el

primero.

La gota es una gota con base de agua. Dicha gota con base de agua puede contener cualquier clase de especies naturales, artificiales, orgánicas o inorgánicas tales como, por ejemplo, moléculas biológicas, proteínas, complejos de proteínas, enzimas, haptenos, antígenos, anticuerpos, aptámeros, epítomos, ácidos nucleicos, péptidos, polisacáridos, glucopéptidos, células, agregados celulares, medicamentos, productos químicos, látex, organismos vivos o muertos, virus, orgánulos, liposomas, vesículas, micelas, polímeros sintéticos o naturales, nanopartículas, moléculas luminiscentes, puntos cuánticos, reactivos químicos, tampones, tensioactivos y cualquier combinación de dichas especies.

La invención puede permitir la manipulación de paquetes que tienen un tamaño comparable con la sección del microcanal.

Como una forma de realización a modo de ejemplo, el área de la sección más pequeña de dicho paquete es al menos igual a la mitad del área de la sección del microcanal en la ubicación de un primer electrodo o en la ubicación de un segundo electrodo, cualquiera que sea el más pequeño.

El paquete puede ser una gota esférica con un diámetro comparable con el diámetro del microcanal, o una gota alargada que abarque toda la sección del microcanal.

El método de conformidad con la presente invención puede utilizarse para fusionar coloides para formar una cadena, por ejemplo.

El método también puede utilizarse para el procesamiento de selección.

Cuando el campo eléctrico es generado por al menos dos electrodos espaciados axialmente a lo largo del eje del microcanal, estando separados dichos electrodos por un espacio, el método puede comprender:

- antes de generar dicho campo eléctrico, colocar dos paquetes en el espacio entre los electrodos, estando dichos paquetes en equilibrio estático,
- generar dicho campo eléctrico.

En una variante, los paquetes para colapsar pueden colocarse inicialmente en una corriente que fluye tal como para realizar una operación de colapso en vuelo.

El método puede comprender así:

- posicionar dos paquetes en el microcanal, al menos uno de los cuales esté fuera del espacio entre los electrodos,
- desplazar los paquetes hacia el espacio, por ejemplo, a través de una corriente que fluya en el microcanal,
- generar dicho campo eléctrico al menos cuando los paquetes están ubicados en el espacio. En una forma de realización a modo de ejemplo de la invención, al menos uno de dichos paquetes contiene material biológico, por ejemplo, una célula o un núcleo de citoplasma. El método para colapsar al menos dos paquetes es particularmente ventajoso cuando los paquetes contienen una membrana biológica.

Dicho método puede llevarse a cabo para formar hibridoma o manipular células fundadoras embrionarias.

La invención puede entenderse mejor leyendo la siguiente descripción detallada de formas de realización no limitantes, y examinando los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es una vista parcial esquemática de un dispositivo microfluídico según la invención.

La Figura 2 es una vista esquemática en sección transversal del dispositivo de la Figura 1.

La Figura 3 es una vista esquemática en perspectiva de un elemento de soporte del dispositivo de la Figura 2.

Las Figuras 4A-4C y 5A-5C ilustran esquemáticamente y de forma respectiva tres etapas de dos operaciones de coalescencia de conformidad con la invención.

Las Figuras 6A-6C ilustran esquemáticamente, y de forma parcial, tres etapas de la división en partes alícuotas de una gota de conformidad con la invención.

La Figura 7 es una vista esquemática de una distribución de campo eléctrico en una parte del microcanal.

La Figura 8 es una vista parcial esquemática de un dispositivo de conformidad con una variante de la invención, y

Las Figuras 9 y 13 ilustran esquemáticamente, y de manera parcial, otras variantes de la invención.

5 La Figura 14 traza la tensión interfacial entre el fluorosurfactante 1H, 1H, 2H, 2H perfluorodecan-1-ol y el aceite fluorado FC-40, medido en el ejemplo 11.

La Figura 15 ilustra esquemáticamente, y de manera parcial, un sistema de PCR en ciclo utilizado en los ejemplos 12 y 13 para amplificar el ADN en flujo segmentado según la invención.

10 La Figura 16 es una electroforesis en gel del producto de amplificación en un tren de gotas, tal como se da a conocer en el ejemplo 12.

15 La Figura 17 es una verificación de la ausencia de contaminación entre las gotas próximas, tal como se da a conocer en el ejemplo 13.

La Figura 18 muestra formas de gotas en un capilar de silicona no lavado y sin tratamiento, con FC40 como fluido portador (a) Gota inicial, (b) Gota posterior (> 60ª gota en el tren); con soluciones de fluorosurfactantes a diferentes concentraciones (c) 0.15% en peso de fluorosurfactantes, (d) 0.5% en peso de fluorosurfactantes, (e) 3.0% en peso de fluorosurfactantes (ejemplos 14A y 14 B),

20 La Figura 19 muestra formas de gotas en tubos de silicio silinizados en una atmósfera de argón, (a) 7.5% en volumen de silano, (b) 5% en volumen de silano, gotas iniciales, (c) 5% en volumen de silano, gotas posteriores (> 100ª gota), (d) 1% en volumen de silano, (e) 0.25% en volumen de silano (ejemplo 14C).

25 La Figura 20 muestra formas de gotas en tubos silinizados en aire, (a) 10% en volumen de silano, reacción de 5 minutos, (b) 7.5% en volumen de silano, reacción de 5 minutos, forma de gota posterior (> 110ª gota en el tren), (c) 5% en volumen de silano, reacción de 30 minutos, activación con HCl, (d) 5% en volumen de silano, reacción de 30 minutos, activación por plasma (e) 2.5% en volumen de silano, reacción de 30 minutos (ejemplo 14 D).

30 La Figura 21 muestra formas de gotas en tubos de silicio silanizado con 0.5% en peso de fluorosurfactante (a) 2.5% en volumen de silano, reacción de 30 minutos, 200ª gota, (b) 5% en volumen de silano, reacción de 30 minutos, 200ª gota (ejemplo 14E), y

35 Las Figuras 22 a 24 representan de manera esquemática y parcial un conector libre de contaminación según la invención.

1: Primer ejemplo de forma de realización de la invención

40 La Figura 1 muestra un dispositivo microfluídico 1 según la invención, comprendiendo dicho dispositivo un microcanal 2 y un conjunto de electrodos 3. El microcanal 2 tiene un eje longitudinal X y una sección transversal interna que es circular.

45 El conjunto de electrodos 3 comprende un par de electrodos 4, comprendiendo cada electrodo 4 un cilindro de metal, por ejemplo, aluminio. La longitud de cada electrodo 4 es, por ejemplo, 4 mm y el diámetro interno de 1.5 mm y el diámetro externo de 1.9 mm.

50 Los electrodos 4 se colocan alrededor del microcanal 2 y están separados a lo largo del eje X por un espacio 6. Los electrodos 4 están conectados a una unidad de generador 9 a través de elementos de conexión 8 que comprenden cables eléctricos.

55 Los electrodos 4 están alojados en un soporte 10 que comprende dos elementos de soporte 11, siendo cada uno un paralelepípedo prácticamente rectangular realizado de Plexiglas®, por ejemplo, con una anchura de 24 mm, una altura de 20 mm y una profundidad de 20 mm.

Se perfora un primer orificio cilíndrico 12, por ejemplo, de 1.9 mm de diámetro, en cada elemento de soporte 11 a lo largo del eje X en el centro del elemento de soporte 11 para sostener el electrodo 4. El primer orificio 12 se extiende desde una cara frontal 13 hacia una cara posterior 14 del elemento de soporte 11, opuesto a la cara frontal 13.

60 Se perfora un segundo orificio 17 perpendicular al primer orificio 12 para recibir un elemento de conexión 8 que conecta el electrodo correspondiente 4 a la unidad de generador 9.

65 Cada elemento de soporte 11 comprende, además, dos orificios 20 y 21 cuyos ejes son paralelos al eje del orificio 12 y están configurados para recibir, respectivamente, un tornillo de Teflon® 22 y una varilla metálica 23 para mantener los elementos de soporte 11 ensamblados con los agujeros 12 que le son colineales.

Cada electrodo 4 está montado en el elemento de soporte correspondiente 11 de manera que el electrodo 4 esté a ras con la cara frontal 13, tal como se ilustra en la Figura 2.

5 Las caras frontales 13 de los elementos de soporte 11 están separadas, por ejemplo, por una longitud de 2 mm que define un espacio de 2 mm 6 entre los electrodos 4.

10 La unidad de generador 9 comprende, por ejemplo, un generador de funciones conectado a un amplificador tal como para suministrar tensiones sinusoidales de hasta 2 kV con frecuencias de hasta 1 kHz. La unidad de generador 9 también puede comprender una unidad central de procesamiento tal como un ordenador para controlar de manera programable la tensión suministrada a los electrodos 4.

La Figura 3 muestra de manera esquemática la orientación del campo eléctrico proporcionada por las flechas junto con las líneas equipotenciales.

15 Tal como se puede observar, el campo eléctrico es prácticamente colineal al eje X del microcanal 2 y, por lo tanto, favorece la electrocoalescencia y minimiza cualquier efecto de dielectroforesis.

20 El dispositivo 1 puede montarse en una etapa de observación de un microscopio binocular 30 conectado a una cámara CCD 31 y una grabadora de video 32, tal como se ilustra en la Figura 1, permitiendo así la supervisión del colapso de dos paquetes o la división de un paquete en el microcanal.

El dispositivo puede configurarse de modo que después del colapso o división, los paquetes se vacíen.

25 **2: Segunda forma de realización a modo de ejemplo de la invención**

La Figura 8 muestra un conjunto de electrodos 3' que comprende dos electrodos compuestos 35, cada uno de los cuales tiene un par de placas equipotenciales prácticamente paralelas 36 enfrentadas entre sí y superponiendo un microcanal 2' que tiene una sección transversal rectangular. Cada par de placas 36 está conectada a un polo respectivo de la unidad de generador 9.

30 **3: Ejemplo de un método de oscilación**

35 En una forma de realización, el fluido de gotas es una solución tampón TBE 5x (Trisbase® 0.45 M, ácido bórico 0.45 M y EDTA 0.01 M; Sigma®) teñido con azul de bromofenol al 0.25% en peso para observación en un fluido portador de aceite fluorado (FC-40, 3M) con 0.5% en peso de 1H, 1H, 2H, 2H perfluorodecan-1-ol (Fluorochem®) agregado para evitar interacciones con la pared del microcanal 2. La conductividad de la gota es de 3 mS/cm y la conductividad del fluido portador es $2.5 \cdot 10^{-13}$ mS/cm. Para la formación de gotas, los dos fluidos se colocan en capas en un tubo Eppendorf® de 1.5 ml de modo que la capa inferior consta de aproximadamente 0.6 ml del fluido portador (FC-40/1H, 1H, 2H, 2H perfluorodecan-1-ol) y la capa superior consta de aproximadamente 0.6 ml del fluido de gotas (TBE 5x/azul de bromofenol).

40 El microcanal 2 se rellena desde una bomba de jeringa (comercializada por KD Scientific) usando, por ejemplo, una jeringa Hamilton® hermética al gas de 250 µl rellena con el fluido portador. El exceso de fluido bombeado al microcanal puede recogerse en un depósito de residuos. Después de rellenar completamente el capilar, el microcanal 2 se coloca en la fase de fluido portador del tubo Eppendorf® en capas. La bomba se aspira posteriormente a una velocidad de 1 ml/h. Las gotas se forman al hacer oscilar el microcanal entre la fase portadora y la fase de la gota, ya sea manualmente o uniendo el microcanal a un oscilador mecánico, por ejemplo, a aproximadamente 2 Hz. Las gotas formadas por el presente método tienen aproximadamente el mismo diámetro que el canal.

50 **4: Método a modo de ejemplo para desplazar una gota en un microcanal**

El método puede llevarse a cabo con cualquiera de los dispositivos definidos con anterioridad.

55 Una sola gota se forma mediante el método de oscilación descrito con anterioridad. Utilizando la bomba de jeringa, la gota se aspira en el espacio 6 entre los electrodos 4. Cuando la gota ha alcanzado la sección del espacio inmediatamente antes del electrodo de flujo ascendente, el flujo se detiene y el sistema se deja asentar en equilibrio. A continuación, se aplica una tensión continua, con la tensión positiva aplicada al electrodo 4 más próximo a la gota y con el electrodo más alejado conectado a tierra. El movimiento de la gota hacia el electrodo conectado a tierra se puede registrar en video y medir el tiempo para un desplazamiento dado. La gota solamente se desplaza cuando está entre los electrodos 4 y se detiene cuando está por debajo del electrodo conectado a tierra.

60 **5: Ejemplo de coalescencia estática**

La coalescencia estática puede ser realizada por cualquiera de los dispositivos definidos con anterioridad.

65 Las gotas se forman mediante el método de oscilación descrito con anterioridad de modo que la separación entre las

dos gotas es mayor que el espacio 6 entre los electrodos 4. Una primera gota se introduce inicialmente en el espacio 6 entre los electrodos 4 utilizando la bomba de jeringa. Cuando la gota llega al electrodo de flujo ascendente, se detiene el flujo. La gota se desplaza contra la dirección del flujo aplicado previamente utilizando el accionamiento del campo eléctrico descrito con anterioridad hasta que alcanza el electrodo de flujo descendente. El flujo se reinicia hasta que la primera gota vuelve al electrodo de flujo ascendente. Este procedimiento se repite hasta que aparece una segunda gota entre los electrodos 4. La posición del microcanal en los electrodos se ajusta entonces para que la segunda gota quede fuera del espacio 6 entre los electrodos. La primera gota se desplaza contra la dirección del flujo aplicado previamente hasta que el espacio entre las dos gotas sea, por ejemplo, de 0.5 mm. A continuación, el microcanal se reposiciona de modo que el punto intermedio entre los dos bordes más cercanos de las gotas se centre entre los dos electrodos y se permita que el sistema se estabilice en equilibrio.

En el ejemplo representado en las Figuras 4A a 4C, la primera gota 40 tiene un diámetro de aproximadamente 540 μm y la segunda gota 41 tiene un diámetro de aproximadamente 560 μm . Al aplicar una tensión sinusoidal de 2 kV, 1 kHz a los electrodos 4, el desplazamiento inicial de la gota es constante, con la gota más pequeña 40 desplazándose a una velocidad ligeramente más alta (Figuras 4A y 4B). Cuando las gotas 40 y 41 entran en estrecho contacto, aceleran rápidamente y drenan la película interpuesta (Figura 4C), lo que indica que el dispositivo 1 debe proporcionar una coalescencia prácticamente instantánea de las gotas que están inicialmente juntas, tal como ocurre después de que dos gotas lleguen de manera simultánea en una unión en T.

6: Ejemplo de coalescencia en vuelo

La coalescencia en vuelo puede ser realizada por cualquiera de los dispositivos definidos con anterioridad.

La primera gota 43 puede tener un diámetro de aproximadamente 580 μm y la segunda gota puede tener un diámetro de aproximadamente 560 μm .

Después de colocar las gotas, el microcanal se desplaza de manera que ambas gotas estén fuera del espacio 6 entre los electrodos 4. A continuación, se aplica una tensión sinusoidal de 2 kV, 1 kHz a los electrodos espaciados de 2 mm y se mantiene durante toda la duración del experimento. Después de aplicar el campo eléctrico, el flujo se inicia aspirando con la bomba de jeringa a 50 $\mu\text{l/h}$.

La gota 42 entra en el espacio 6 entre los electrodos 4 y se desplaza a una velocidad constante en ausencia de la gota 43 (Figura 5A). La interfaz principal de la gota 43 aparece después de 13 segundos, pero no tiene efecto sobre la gota 42. Solamente cuando la gota posterior está bien dentro del espacio 6 entre los electrodos se manifiesta la fuerza dipolar. A partir de entonces, el tiempo de coalescencia es prácticamente el mismo que en el caso estático (aproximadamente 8 segundos) para estas gotas ampliamente separadas, pero la dinámica es ligeramente diferente debido al flujo. La fuerza dipolar es lo suficientemente fuerte como para detener la gota 42 (Figura 5B), por lo que la gota 43 se desplaza hacia ella a una velocidad constante, cerrando la distancia prácticamente a la misma velocidad que en el caso estático. Una vez que las gotas están juntas, la fuerte fuerza dipolar drena rápidamente el fluido interviniente y se logra la coalescencia (Figura 5C).

7: Ejemplo de división de gotas

Se forma una única gota grande 46 oscilando la interfaz tal como se describió con anterioridad, pero a una frecuencia más baja. La gota 46 se lleva al espacio 6 entre los electrodos, aspirando con la bomba de jeringa (Figura 6A). La gota representada en la presente forma de realización es un elipsoide de revolución con un eje de 2.5 mm de longitud. Al aplicar una tensión cuadrada de 2 kV, 0.1 Hz, la gota 46 se divide en dos gotas más pequeñas y estables 47 (Figuras 6B y 6C) que son expulsadas del espacio 6.

Las condiciones de funcionamiento típicas para lograr una división de gotas limpia, es decir, una gran gota dividida en dos más pequeñas y estables sin formación de gotas satélite, pueden consistir en una tensión cuadrada con una frecuencia entre 0.1 y 1 Hz y una amplitud entre 1 kV y 2 kV. Bajo dicha condición, la gota puede romperse en menos de 1 minuto. Cuanto más baja es la tensión aplicada, más "limpia" es la división, pero más tiempo puede llevar. La longitud de la gota puede ser aproximadamente la longitud del espacio 6.

8: Otras formas de realización a modo de ejemplo de la invención

Tal como se ilustra en las Figuras 9 y 10, la parte de microcanal 50 entre los electrodos 4 puede formar una intersección en T con un canal transversal 51. Después de la coalescencia de las gotas causadas por el campo eléctrico entre los electrodos 4, la gota resultante 52 puede accionarse en el canal transversal 51, por ejemplo, utilizando una bomba de jeringa conectada al canal transversal 51.

Tal como se ilustra en las Figuras 11 y 12, la división de gotas puede realizarse extrayendo una gota 53 desde una masa relativamente grande de fluido 54 aplicando el campo eléctrico entre los dos electrodos 4.

Por lo tanto, las gotas 53 pueden formarse cuando se desee, por ejemplo, controlando de manera programable los

electrodos 4.

9: Otra forma de realización a modo de ejemplo de la invención

5 La Figura 13 muestra un dispositivo 60 de conformidad con la invención, comprendiendo dicho dispositivo 60 un microcanal 61 conectado en una parte 62 a los canales laterales primero y segundo 63 y 64.

La parte 62 puede, por ejemplo, estar situada prácticamente en el medio del microcanal.

10 En la presente forma de realización, el microcanal 61 puede tener un espesor de aproximadamente 100 μm y una anchura de aproximadamente 300 μm y el canal lateral 63 un espesor de aproximadamente 100 μm y una anchura de aproximadamente 50 μm .

15 El canal lateral 63 está conectado a un sistema de suministro 66 que comprende una bomba de jeringa que tiene un depósito 67 que contiene una solución de tensioactivo de ácido oleico y SDS en hexadecano, a una concentración superior a la concentración micelar crítica.

20 El microcanal 61 se rellena con una solución que contiene hexadecano que contiene SPAN®80 a una concentración ajustada para evitar la interacción de las gotas acuosas con las paredes del microcanal.

El canal lateral 64 está conectado a una bomba de jeringa 68 en modo de aspiración configurada para aspirar la solución del microcanal 61.

25 Se introducen dos gotas 70 de un 5X TBE Buffer y se desplazan en el microcanal 61 por sus dos extremos. La aspiración de las gotas 70 por ambos extremos se sincroniza de modo que las gotas 70 lleguen desde ambos lados al mismo tiempo a la parte 62. Cuando las gotas 70 están en la parte 62, una solución de tensioactivo contenida en el depósito 67 es proporcionada por el sistema de suministro 66 en la parte 62 del microcanal con una velocidad de flujo predeterminada de modo que las gotas 70 sean objeto de coalescencia. La velocidad de flujo óptima puede determinarse aumentando progresivamente el flujo hasta que las gotas se unan en cada colisión, lo que establece la velocidad de flujo óptima.

30 En otra forma de realización, la solución de tensioactivo puede proporcionarse en pulsos sincronizados con la llegada del par de gotas a la parte de conexión 62.

35 La gota resultante 71 se recoge en la bomba de jeringa 68 para uso adicional o, por ejemplo, se transfiere a otro microcanal para su detección.

10: Ejemplo de formación y transporte de matrices regulares de gotas de agua en un aceite fluorado contenido en un tubo capilar de fluoropolímero

40 Los trenes de gotas se crean utilizando un conector en Y (Upchurch Scientific) conectado a una válvula electro-punción (NRResearch, Caldwell NJ). Una entrada al conector Y se rellena con una solución tampón TBE 5x (Trisbase 0.45 M, ácido bórico 0.45 M y EDTA 0.01 M, Sigma) teñida con azul de bromofenol al 0.25% en peso para facilitar la observación. El otro lado del conector en Y y el capilar de prueba (PFA, d.i. 800 μm , Upchurch Scientific) se imprimaron con el aceite fluorado a granel FC-40 (3M) o FC-40 que contiene varias cantidades de un tensioactivo de fluoroalcohol (1H, 1H, 2H, 2H perfluorodecan-1-ol, Fluorochem). Los trenes de gotas se crearon ciclando la electroválvula con un programa LabView mientras aspiraban con una bomba de jeringa de módulo de mililitro Harvard controlada por ordenador. Un ciclo típico consiste en 6 segundos de aspiración desde la línea TBE y 8 segundos de aspiración desde la línea FC-40. Las gotas se observaron con un microscopio binocular (Olympus) y se registraron utilizando una cámara CCD (Hitachi) y WinTV.

45 La estabilidad de los trenes de gotas en el sistema fluido se prueba en primer lugar. En un trabajo previo sobre PCR de flujo segmentado, la contaminación cruzada entre las gotas se atribuyó a la inestabilidad de las gotas y la formación de pequeñas gotas satelitales. No solamente se quería buscar la rotura de las gotas en gotas individuales, sino también observar la estabilidad general de los trenes de gotas que contienen varios centenares de gotas. La estabilidad de dichos trenes es esencial para las aplicaciones de alto rendimiento de nuestra técnica.

50 Cuando las gotas se arrastran en FC-40 puro, se ha observado que ocasionalmente se adhieren a las paredes. Esto es imprevisto, puesto que tanto las paredes como el fluido portador están fluorados, y se espera que el FC-40 humedezca fuertemente las paredes. La adherencia se ha atribuido a imperfecciones (ya sea rugosidad o falta de homogeneidad química) en las paredes capilares, lo que se esperaría en capilares a granel fabricados por un proceso de extrusión. La capa de FC-40 entre las gotas y la pared capilar es muy delgada, y pequeñas perturbaciones en la superficie de la pared podrían perturbar el flujo de lubricación. En cualquier caso, una vez que una gota queda atrapada en la pared, incluso temporalmente, el tren en su conjunto pierde su estabilidad. La gota posterior choca con la gota arrastrada e intercambia fluido, la gota arrastrada se libera de la pared, y la gota que ejerce la fuerza queda atrapada. Este proceso continúa hasta el infinito y sería catastrófico en cualquier aplicación de PCR.

El tensioactivo de fluoroalcohol se agrega luego a FC-40 en el intervalo de 0.5 – 3.0% en peso. Al hacer trenes que contienen más de 200 gotas, no se observan pasadores transitorios a las paredes, formación de gotas satelitales o inestabilidades en el tren de gotas.

5

11: Medición de la tensión interfacial entre una gota de agua y un solvente que contiene fluorosurfactante

Las mediciones de tensión interfacial se realizaron utilizando un tensiómetro casero de caída de volumen. La gota de FC-40/surfactante se dispensa en un depósito de solución tampón TBE 5x desde un tubo capilar Teflon® de 0.8 mm de diámetro interno. Utilizando una jeringa hermética al gas Hamilton de 50 µL y una bomba de jeringa Hamilton PSD/2 a una resolución máxima, el volumen de la gota podría incrementarse en incrementos de 25 nL con tiempos de espera arbitrarios entre las etapas. Para permitir el equilibrio del surfactante, normalmente habría que esperar 30 segundos entre las etapas. Las mediciones de tensión son el promedio de al menos 15 gotas diferentes, corregidas por la humectación de la punta de Teflon®.

10

15

12: Ejemplo de amplificación por PCR de ADN en un dispositivo según la invención, que implica un canal realizado de fluoropolímero a granel

En la Figura 15 se representa un dispositivo de PCR 80, comprendiendo dicho dispositivo 80 un cilindro de cobre de 4 cm de diámetro 81 mecanizado en tres piezas correspondientes a las zonas desnaturalizantes 82, de recocido 83 y de alargamiento 84. La zona de alargamiento 84 es dos veces el tamaño de las otras dos zonas, ocupando así la mitad del cilindro 81. Las tres zonas están aisladas una de otra por láminas de policarbonato 85, que se fijan entre las piezas del cilindro de cobre. Los dos extremos del calentador están cubiertos con un cilindro de policarbonato para proporcionar estabilidad estructural mientras se mantiene el aislamiento entre las dos zonas. Se perforan tres pequeños orificios 88 por la cuarta parte de la longitud del cilindro a través de todo el dispositivo para proporcionar respiraderos para la refrigeración por aire. Dos agujeros pequeños 89 (para los termopares) y un agujero central más grande 90 (para el calentador) se perforan parcialmente a través del cilindro en cada zona de temperatura. Los orificios de calentamiento y termopar no están abiertos en el lado de refrigeración por aire del calentador. Cada zona está cubierta con una capa delgada de papel de aluminio en contacto con la zona respectiva del cilindro de cobre para proporcionar calentamiento desde arriba. Las capas de papel de aluminio están cubiertas por una cubierta de policarbonato y una capa de algodón, aislando así el cilindro y proporcionando una temperatura uniforme a través del capilar. Una pequeña turbina sopla aire ambiente a través de los tres orificios de ventilación por la cuarta parte del cilindro, lo que permite un mejor control de la temperatura y uniformidad.

20

25

30

35

40

Cada zona incluye un calentador de resistencia y dos termopares Pt-100. Los calentadores de resistencia están ubicados en el centro de su zona respectiva, mientras que los termopares están ubicados cerca de la interfaz entre zonas. Los elementos calefactores y los termopares están conectados a la electrónica personalizada. Los termopares se comunican con un control de programa PID personalizado escrito en LabView a través de un multímetro Keithley 2701. La temperatura de cada zona se puede establecer arbitrariamente. Para los experimentos aquí descritos, se ha utilizado una temperatura de desnaturalización de 94°C, una temperatura de recocido de 55.5°C y una temperatura de alargamiento de 72°C. Con nuestro diseño, una diferencia de temperatura de $\pm 0.2^\circ\text{C}$ a través cada zona se consigue.

45

Un tubo capilar PFA transparente de 4.5 metros de longitud 92 (d.i. 800 µm, Upchurch Scientific) entra en el cilindro a través de una ranura en la zona desnaturalizante, proporcionando una etapa de desnaturalización inicial de aproximadamente 1 minuto. El capilar se enrolla 35 veces alrededor del cilindro, lo que corresponde a 35 ciclos de PCR. El capilar sale del calentador a través de un orificio en el segmento de extensión, proporcionando aproximadamente 30 segundos de extensión adicional en el ciclo 35.

50

Amplificación por PCR: La plantilla es un fragmento de ADN de 2823 pares de bases de Litmus 28i (New England Biolabs). Este fragmento se amplifica en 572 pares de bases desde Icon base 2008 hasta Icon base 2580 utilizando cebadores Eurogentec (cebador inferior 5'-CGC-ATT-GCG-GTA-TCT-AGA-ACC-GGT-GAC-GTC-3', cebador superior 5'-AGC-TTG-GAG-CGA-ACG-ACC-3', Eurogentec Oligold). Se prepara una mezcla de PCR de 50 µL utilizando la mezcla de reacción Ready Mix Taq (Sigma) de conformidad con las especificaciones del fabricante con la concentración máxima de molde e imprimadores.

55

El fluido portador es un aceite fluorado a granel FC-40 (3M) que contiene 0.5% - 1.0% en peso. Surfactante de fluoroalcohol (1H, 1H, 2H, 2H perfluorodecan-1-ol, Fluorochem). El tensioactivo evita la adsorción transitoria de gotas a las paredes capilares. Las gotas acuosas de 2 µL se inyectan en la entrada mediante aspiración desde la salida capilar utilizando una bomba Hamilton PSD/2 y una jeringa hermética al gas Hamilton de 100 µL. Las gotas están separadas una de otra por un espaciador FC-40 de 5 µL. Después de inyectar el número deseado de gotas, la salida se desconecta de la bomba Hamilton y la entrada se conecta a una bomba de módulo de mililitros Harvard controlada por ordenador con una jeringa hermética al gas Hamilton de 5 ml. Las gotas circulan a 0.1 cm/s.

60

65

Las gotas se recogen a la salida y se analizan por electroforesis en gel en 1 % en peso de gel de agarosa en solución tampón 0.5x TAE. Se prepara una muestra de amplificación de control amplificando el volumen restante de la mezcla

de PCR de 50 μ L en un ciclador térmico de PCR clásico (Perkin Elmer) con un ciclo de 1 minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Lo que antecede simula el ciclo en nuestro PCR de flujo continuo, aunque el tiempo de retardo para calentar y enfriar el ciclador clásico significa que la amplificación total es aproximadamente el doble que nuestro dispositivo de flujo. Se utiliza una para alícuota de 2 μ l del sistema de control amplificado para la electroforesis en gel.

Se ha obtenido un tren de cinco gotas, cada una de las cuales contiene la mezcla de PCR y la plantilla. El resultado de esta amplificación satisfactoria en todas las gotas se representa en la Figura 16. Banda 1: escala de ADN de 1 kbp (New England Biolabs), Banda 2: muestra de control de 2 μ L de mezcla con ADN, Bandas 3: Gota 1, Banda 4: Gota 2, Banda 5: Gota 3, Banda 6: Gota 4, Banda 7: Gota 5.

El grado de amplificación en el dispositivo de conformidad con la invención (bandas 3 a 7) es comparable al obtenido en el termociclador convencional (banda 2).

15 **Ejemplo 13: Estudio de contaminación entre gotas en un canal realizado fluoropolímero a granel.**

El sistema ha sido probado para contaminación cruzada entre gotas. Todas las condiciones son idénticas al Ejemplo 12, excepto que se hacen dos mezclas de PCR separadas; una primera mezcla contiene la plantilla, los cebadores y la mezcla de reacción Ready Mix y la segunda mezcla es idéntica, excepto que no tiene ninguna plantilla. Se aspiran cinco gotas, pero solamente la tercera gota contiene la plantilla. Para evitar la contaminación de la punta en sí, esta última se lavó con agua destilada entre cada inyección de gotas. La Figura 17 muestra el resultado de la electroforesis en gel de este experimento. Banda 1: escala de ADN de 1 kbp (New England Biolabs), Banda 2: muestra de control de 5 μ l de mezcla sin ADN, Banda 3: muestra de control de 2 μ l de mezcla con ADN, Banda 4: Gota 1 (sin plantilla), Banda 5: Gota 2 (sin plantilla), Banda 6: Gota 3 (con plantilla), Banda 7: Gota 4 (sin plantilla), Banda 8: Gota 5 (sin plantilla). No existe contaminación observable entre las diferentes gotas: la única gota que muestra amplificación de ADN es la tercera gota, que contenía el ADN.

30 **Ejemplo 14: Ejemplo de transporte de gotas en un canal realizado de un material no fluorado con y sin recubrimiento con una capa de material fluorado**

En esta serie de ejemplo, el microcanal está realizado de tubos de silicio (diámetro interno de 0.8 mm) comercializado por Cole Parmer. El fluido portador es FC-40 (3M), y las gotas están realizadas de la solución tampón acuosa TBE 5x. En todos los casos, se crea un tren de gotas siguiendo el mismo protocolo que se da a conocer en el Ejemplo 13, y la forma y migración de las gotas en el tubo se observa directamente y se fotografía con una cámara binocular y CCD.

35 **14A: Gotas de TBE en FC40 puro en tubo de silicona sin tratar**

En algunos casos, las gotas parecían tener una forma esferoidal (Figura 18a) que indica que las paredes no se humedecían. Sin embargo, después de formar un tren de gotas con varios cientos de gotas, las paredes se humedecieron en algún momento durante el tren (Figura 18b). En algunos casos, las primeras gotas se parecían a la Figura 1b. Se presume que el comportamiento inicialmente no humectante observado en algunos casos se debe a un producto residual del proceso de fabricación. Como muchas gotas se desplazan a través del sistema, este producto desconocido se elimina de las paredes. Para probar esta hipótesis, los tubos se lavan con 5 volúmenes de agua destilada y purificada. Posteriormente, las primeras gotas siempre tienen un comportamiento como el de la Figura 18b. Para todos los experimentos posteriores, los tubos tienen siempre 5 volúmenes de agua destilada y purificada para eliminar cualquier variación en las condiciones iniciales.

50 **14B: Gotas de TBE en FC40 con fluorosurfactante agregado, en tubo de silicona sin tratar**

El comportamiento de las gotas se prueba con la adición de varios % en peso de un agente fluorosurfactante, 1H, 1H, 2H, 2H perfluorodecan-1-ol, Fluorochem. El tensioactivo reduce la tensión interfacial entre las gotas y el FC-40, pero no afecta la tensión sólido-líquido. Como resultado, las gotas se desestabilizan y se rompen en muchas gotas pequeñas (Figuras 18c, d, e). La naturaleza de la ruptura depende de la concentración de tensioactivo, pero incluso a niveles extremadamente bajos de fluorosurfactante, las gotas aún son inestables.

55 **14C: Gotas de TBE en FC40 sin fluorosurfactantes añadidos, en un tubo de silicona tratado por silanización en atmósfera de argón**

Los tubos se silanizaron mientras estaban aislados en una atmósfera de argón. Una pequeña cantidad de IN HCl (Sigma) se calentó a aproximadamente 60°C en una placa calefactora. Un extremo de un tubo de silicio limpio se conectó a una jeringa de al menos el doble del volumen del tubo y el otro extremo se colocó en la solución tibia de HCl. El HCl se aspiró en el tubo hasta que la jeringa se llenó parcialmente. El HCl se dejó en los tubos durante 5 minutos, durante los cuales ocasionalmente se hizo oscilar la bomba de la jeringa para proporcionar una mezcla local. A continuación, se extrajo el HCl del tubo y el tubo se secó con un flujo de argón. A continuación, se conectó una jeringa nueva a un extremo del tubo y se colocó el otro extremo del tubo en una solución de fluorosilano y metanol de grado espectroscópico (Sigma). El fluorosilano suele ser 1H, 1H, 2H, 2H, -perfluorooctiltrimetilsilano (Fluorochem).

También se ha probado 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodeciltrietoxisilano (Fluorochem) y prácticamente se obtienen los mismos resultados. Todos los resultados aquí mostrados son para 1H, 1H, 2H, 2H, -perfluorooctiltrimetilsilano (Fluorochem), que se eligió utilizar porque es menos costoso. La solución de silano se aspira en el tubo y se deja durante 5 minutos, durante los cuales ocasionalmente se hace oscilar la bomba de la jeringa para proporcionar una mezcla local. La solución de silano fue extraída del tubo y el tubo se secó con un flujo de argón. El tubo seco se colocó posteriormente en un horno a 110°C durante aproximadamente 20 minutos para fijar los silanos. A continuación, se lavó el tubo con varios volúmenes de metanol y FC-40 antes de realizar la prueba de gotas.

Los resultados de las gotas en los tubos silanizados con argón se muestran en la Figura 19. Para un % en volumen superior a 7.5, no se observó ninguna fijación en los trenes que incluían al menos 200 gotas. Al 5% en volumen, las gotas parecían inicialmente no humectantes, pero finalmente se fijaron a la pared. Para un porcentaje de volumen más bajo, las gotas siempre humedecieron la pared. Se llegó a la conclusión de que es necesario un 7.5% en volumen de fluorosilano para formar una superficie estable y no humectante cuando la reacción se realiza bajo argón.

14D: Gotas de TBE en FC40 sin fluorosurfactante agregado, en un tubo de silicona tratado por silanización en atmósfera de aire

Para simplificar el procedimiento de silanización, los tubos se silanizan en aire. Con el fin de preservar mejor el silano puro, la mezcla de silano/metanol se realiza primero en argón, pero el resto de la reacción se realiza posteriormente en una campana utilizando, prácticamente, el mismo protocolo que el anterior. El % en volumen de silano y el tiempo en que el silano se dejó reaccionar con el tubo (tiempo de reacción) varían. En un caso, la etapa de activación de HCl se sustituye con activación de plasma.

Para un 10% en volumen de silano y un tiempo de reacción de 5 minutos, la silanización en aire era indistinguible del caso en Argón (Figura 20a). Con un 7.5% en volumen de silano y una reacción de 5 minutos, las gotas inicialmente parecían no humectantes, pero finalmente humedecieron las paredes (Figura 20b). Se ha encontrado que con un 5% en volumen de silano, las gotas todavía humedecían las paredes, pero cuando el tiempo de reacción se incrementa a 30 minutos, las gotas no humedecían en todo el tren (> 200 gotas, Figura 20c). Se prueban los mismos parámetros (5% en volumen de silano, reacción de 30 minutos) pero el tubo se coloca en plasma durante 1 minuto en lugar de llenarlo con HCl. Tal como se ilustra en la Figura 20d, la activación del plasma no resultó en una superficie no humectante. Dado que el plasma debe difundirse a través del tubo para la activación, es menos eficiente que la activación líquida por HCl, que puede bombearse a través del tubo. Se ha probado reduciendo aún más la concentración de silano a 2.5% en volumen de silano mientras se conserva el tiempo de reacción de 30 minutos. Tal como se ilustra en la Figura 20e, las paredes están ligeramente mojadas.

La silanización en el aire probablemente produce un recubrimiento menos uniforme en la superficie que en el argón, puesto que el agua en el aire compite con el silano por los sitios de superficie activados. En esencia, la silanización de aire no reduce la tensión de agua sólida tanto como la silanización de argón. Sin embargo, el protocolo aéreo es mucho más simple de realizar y más susceptible de automatización.

14E: Gotas de TBE en FC40 con fluorosurfactante agregado, en un tubo de silicona. Tratado por silanización en atmósfera de aire

Se ha comprobado si los fluorosurfactantes, que reducen en gran medida la tensión interfacial FC-40/agua, son suficientes para superar las no uniformidades (y al mismo tiempo reducir la tensión agua-sólido) que surge de la superficie aire-silanizada. Tal como se indica en la Figura 21, una pequeña concentración de tensioactivo (0.5% en peso) es suficiente para evitar la humectación tanto en 2.5% en volumen de silano como en 5% en volumen de silano, incluso después de formar un tren de 200 gotas.

Ejemplo 15: Verificación por PCR cuantitativa, de contaminación por ADN entre gotas transportadas en dispositivos según la invención preparada en el ejemplo 14

Para probar si las formas de gotas no fijadas no conducen a la contaminación, se ha realizado un conjunto de experimentos utilizando PCR cuantitativa para hacer una prueba sensible de las concentraciones de ADN en diferentes gotas.

Los tubos se prepararon de conformidad con uno de estos protocolos:

1. Sin silano: los tubos se lavaron solamente con varios volúmenes de agua destilada. El fluido portador es FC-40 (3M), preparado de conformidad con el Ejemplo 14A.
2. Silano: los tubos se lavaron y luego se silanizaron en aire según el protocolo del Ejemplo 14D con un 5% en volumen de silano y 30 minutos de tiempo de reacción. El fluido portador es FC-40.
3. Silano + tensioactivo: los tubos se lavaron y luego se silanizaron en aire según el protocolo del Ejemplo 14E. El fluido portador es FC-40 con 0.5% en peso de 1H, 1H, 2H, 2H perfluorodecan-1-ol.

4. Fluoropolímero a granel + tensioactivo. Se prepara un tren de gotas de conformidad con el Ejemplo 13: se utilizaron capilares de teflón tal como los suministró el fabricante. El fluido portador es FC-40 con 0.5% en peso de 1H, 1H, 2H, 2H perfluorodecan-1-ol.

Un extremo del tubo se conectó a un conector en Y, y las salidas del conector en Y se seleccionaron utilizando una válvula de electrochoque. Una salida va a una bomba de jeringa de módulo de mililitros de Harvard y una jeringa hermética al gas Hamilton de 5 ml y la segunda salida va a una bomba de jeringa Hamilton PSD/2 con una jeringa hermética al gas Hamilton de 100 μ l. El Hamilton PSD/2 se utilizó para obtener todas las gotas (por aspiración) o dispensar las gotas del tubo (por bombeo). El módulo de mililitros de Hamilton se utilizó para la oscilación de gotas dentro del tubo. Antes de cada experimento, el capilar se rellenó completamente con el fluido portador y el extremo abierto se colocó en un depósito de fluido portador.

Las gotas son mezclas de la mezcla de PCR Taqman para PCR cuantitativa que contiene la enzima polimerasa Gold Taq (Applied Biosystems), el kit de reactivos centrales qPCR (Eurogentec), cebadores específicos y una sonda fluorescente (3'-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-5', Applied Biosystems). Las muestras "mixtas" contenían todos los componentes para PCR, excepto la plantilla. Las muestras de "ADN" contienen ADNc aislado de la línea celular A549 a una concentración de 6.25 ng/ μ l. El fragmento se amplifica en 149 pb correspondientes al gen RPLPO utilizando cebadores Prologo (cebador superior 3'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-5'; cebador inferior 3'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-5'). Se realizaron dos depósitos para cada experimento, un depósito con suficiente mezcla para cada gota de control (normalmente 30 μ l) y un segundo depósito con suficiente mezcla y plantilla para las gotas de ADNc (normalmente 22 μ l).

Se ha probado la contaminación durante la inyección mediante el siguiente procedimiento. Se han aspirado 2 μ l del depósito de ADN y luego 4 μ l del depósito de fluido portador. A continuación, se lavó la punta sumergiéndola en un depósito de agua destilada y secándola con un ChemWipe. Las siguientes 5 gotas se formaron aspirando 2 μ l del depósito de mezcla y 4 μ l del depósito de fluido portador. Después de que se formaron todas las gotas, se invirtió el procedimiento y se recogió cada gota en un tubo Eppendorf separado. Los tubos Eppendorf se almacenaron a -80°C antes de la PCR cuantitativa.

Los contenidos de cada gota se analizaron por PCR cuantitativa en una máquina Taqman 7700 qPCR (Applied Biosystems). En estos experimentos, un valor de 35 indica que no había una cantidad detectable de ADNc en las gotas (es decir, 35 ciclos de amplificación sin una señal de fluorescencia por encima del umbral de ruido), y cada incremento de número entero corresponde a una reducción a la mitad en la masa de ADNc.

La Tabla 1 presenta los resultados del experimento de contaminación de entrada. Hubo una contaminación significativa en el capilar no tratado, tal como se esperaría de la forma de la gota. También hubo contaminación en el capilar silanizado. Sin embargo, no hubo contaminación en el depósito de la mezcla, por lo que podríamos concluir que la contaminación se produce por el transporte de gotas dentro del capilar. Para el capilar silanizado con fluorosurfactante, observamos alguna contaminación en la primera gota de lavado y contaminación equivalente en el depósito de la mezcla. Esto nos llevó a creer que la contaminación ocurrió en la punta durante la transferencia, y que un lavado más profundo de la punta después de la aspiración de la gota de ADN debería ser suficiente para eliminar la contaminación en la entrada utilizando un capilar silanizado y un fluorosurfactante. No hubo contaminación con la punta de teflón.

A continuación, se probó la capacidad del tensioactivo fluorosurfactante y el capilar silanizado para evitar la contaminación mientras las gotas estaban en tránsito. Utilizando prácticamente el mismo procedimiento de aspiración que el anterior con el fluorosurfactante y un capilar silanizado, en primer lugar, se obtuvo dos gotas de mezcla, luego una gota de ADNc y luego dos gotas de mezcla. La diferencia entre el presente protocolo de inyección y el anterior es que ahora se lava la punta en dos depósitos de agua destilada separados después de inyectar la gota de ADN, con el objetivo de reducir la contaminación en la punta. Al final del procedimiento, se obtuvo una gota de ADNc de 2 μ l con dos gotas de mezcla de 2 μ l a cada lado (Control 1 y 2 al frente, Control 3 y 4 al final), donde cada gota estaba separada por 4 μ l del fluido portador.

A continuación, se procedió a la aspiración utilizando el módulo de mililitros de Harvard para que las gotas estuvieran en una sección recta del capilar colocado debajo de un microscopio binocular Olympus. Utilizando control informático, se realizó una oscilación del módulo de mililitros de Harvard para que se atrajera las gotas en una distancia de 5 cm en el capilar a una velocidad media de 1 mm/seg., y luego se empujaron las gotas a una distancia de 5 cm a una velocidad media de 1 mm/seg., de modo que un solo ciclo no resultó en un desplazamiento neto de las gotas. Se realizaron 50 de dichos ciclos, de modo que la distancia total recorrida por las gotas (5 m) es comparable a la requerida en nuestra máquina de PCR de flujo continuo. Al oscilar las gotas, en lugar de empujarlas a una velocidad constante a través de un capilar de 5 m, se simuló las condiciones en una operación de alto rendimiento. De manera ocasional, se observó las gotas con el microscopio para cerciorarse de que no mojaran las paredes.

Después de completar los 50 ciclos, se procedió a recoger las gotas en capilares Eppendorf individuales. Después de expulsar cada gota, se procedió a la aspiración de una gota de lavado de 2 μ l de agua destilada para limpiar la punta. También se recogieron las gotas de lavado. Todas las gotas y el depósito de la mezcla se analizaron por PCR

cuantitativa como con anterioridad.

La Tabla 2 presenta los resultados de la PCR cuantitativa. No hubo contaminación detectable en ninguna de las gotas de control. Además, no hubo contaminación detectable en las gotas de lavado. Hubo algo de contaminación en el depósito de mezcla, pero esto no condujo a la contaminación en ninguna de las gotas de control. Se llegó a la conclusión de que la combinación del tensioactivo fluorosurfirero y un capilar silanizado debería ser suficiente para evitar la contaminación en aplicaciones de alto rendimiento.

Se realizó prácticamente el mismo experimento de oscilación utilizando un capilar de teflón y fluorosurfactante. La única diferencia es que en este experimento no se procedió al lavado de la punta cuando se recogieron las gotas ni se utilizó las gotas de lavado adicionales.

Los resultados con un tubo de teflón y fluorosurfactante se presentan en la Tabla 3. Al igual que en la prueba de contaminación de entrada, no hay contaminación en la mezcla, lo que indica que el lavado es suficiente para eliminar el ADN de la punta. Hay algo de contaminación en la gota 2. Se estima que esta contaminación se debe a que no se lava la punta al recoger las gotas. La Gota 2 sale del sistema inmediatamente después de la gota de ADNc. Es posible que una pequeña parte de la gota de ADNc se haya arrastrado por una imperfección en la superficie de la punta, que luego se transferiría a la Gota 2. Una recogida automatizada de gotas o un procedimiento de detección en línea deberían eliminar esta fuente de contaminación.

Tabla 1. Resultados cuantitativos de PCR para la contaminación en la entrada. 35.00 corresponde a ADNc no detectable, y cada disminución de número entero corresponde a una duplicación en la masa relativa de ADNc.

Sin silano		Silano		Silano + Surfactante		Teflón + Surfactante	
Gotas	Valor de Q PCR	Gotas	Valor de Q PCR	Gotas	Valor de Q PCR	Gotas	Valor de Q PCR
ADNc	19.90	ADNc	20.32	ADNc	20.29	ADNc	19.74
Lavado 1	32.99	Lavado 1	32.18	Lavado 1	32.89	Lavado 1	35.00
Lavado 2	35.00	Lavado 2	33.66	Lavado 2	34.36	Lavado 2	35.00
Lavado 3	32.15	Lavado 3	34.91	Lavado 3	34.77	Lavado 3	35.00
Lavado 4	32.54	Lavado 4	35.00	Lavado 4	35.00	Lavado 4	35.00
Lavado 5	35.00	Lavado 5	34.92	Lavado 5	35.00	Lavado 5	35.00
Depósito de mezcla	33.15	Depósito de mezcla	35.00	Depósito de mezcla	33.13	Depósito de mezcla	35.00

Tabla 2. Resultados cuantitativos de la PCR para la contaminación durante el ciclo en un capilar silanizado con fluorosurfactante. 35.00 corresponde a ADNc no detectable, y cada disminución de número entero corresponde a una duplicación en la masa relativa de ADNc.

Gota	Valor de Q PCR
Control 1	35.00
Control 2	35.00
ADNc	20.17
Control 3	35.00
Control 4	35.00
Lavado 1	35.00
Lavado 2	35.00
Lavado 3	35.00
Lavado 4	35.00
Lavado 5	35.00
Depósito de mezcla	33.90

Tabla 3. Resultados cuantitativos de la PCR para la contaminación durante el ciclo en un capilar de teflón con fluorosurfactante. 35.00 corresponde a ADNc no detectable, y cada disminución de número entero corresponde a una duplicación en la masa relativa de ADNc.

Gota	Valor de Q PCR
Control 1	35.00
Control 2	30.19
ADNc	19.83
Control 3	35.00
Control 4	35.00
Depósito de mezcla	35.00

5

Ejemplo 16: diseño y fabricación de un conector en T libre de contaminación

Este ejemplo ilustra el diseño de un conector T PDMS 100 con un volumen muerto muy bajo que permite conectar sin contaminación tres entradas diferentes compatibles con el uso de válvulas de presión.

10

El conector 100 está realizado en PDMS (KODAK SYLGARD 184) con una proporción 1:10 de agente de curado. El molde 101 utilizado para fabricar el conector 100 es un paralelepípedo de PMMA (longitud interna y anchura de 9 mm, altura interna de 8 mm). Se perforan agujeros 102 de diámetro interno de 800 μm en el centro de tres caras 103 del paralelepípedo. Se introduce una primera pieza 104 de 5 mm del capilar 105 de Teflon® (diámetro externo 800 μm) dentro del extremo de un segundo capilar de teflón de 3 cm de longitud (diámetro externo 1.5 mm, diámetro interno 800 μm) y sobresale 1.5 mm. Se hacen tres piezas de esta manera y se introducen y mantienen dentro del paralelepípedo para formar una T con el tubo más pequeño uno frente al otro (véase Figura 22). El PDMS 106 se desgasifica luego durante 20 minutos, se vierte en el molde así construido y se coloca en un horno a 65°C durante tres horas.

15

20

Transcurridas las tres horas, las piezas de Teflon® 104 y 105 se retiran tirando suavemente de ellas, y el conector en T obtenido se saca del molde 101. El conector en T 100 tiene tres puertos 108, cada uno de ellos comprendiendo partes huecas cilíndricas coaxiales una después de otra, teniendo la exterior 110 un diámetro de 1.5 mm en una longitud de 3 mm, la interna 111 tiene 800 μm de diámetro en una longitud de 1.5 mm. A continuación, se introducen tubos capilares de silicona de 5 cm 109 (Cole-Parmer; diámetro exterior 1.8 mm, diámetro interior 800 μm) recubiertos con caucho de silicio (Dow Corning) en 3 mm (correspondiente al cilindro exterior) en cada orificio de la T-conector, y el conector se fortalece al agregar más goma alrededor del tubo cerca de la entrada del PDMS T. Debido a la elasticidad de silicio y PDMS, es posible empujar el tubo de silicio de 1.8 mm de diámetro exterior en el 1.5 mm diámetro del orificio de la T, proporcionando así una buena estanqueidad de la unión. El conector obtenido se coloca en el horno durante dos horas.

25

30

El conector T 100 con tubo capilar de silicio se silaniza adicionalmente con el método descrito en el Ejemplo 14. Con el presente método se obtiene un conector sólido con muy bajo volumen muerto y sin fugas incluso a alta presión. Además, el uso del tubo de silicio permite el uso de válvulas de presión que no tienen volumen muerto.

35

Ejemplos de aplicaciones

Un dispositivo obtenido de conformidad con la invención puede utilizarse para llevar a cabo, por ejemplo:

40

- mezcla
- detección de ácido nucleico,
- amplificación de ácido nucleico, p. ej., por PCR, NASBA, amplificación de círculo rodante
- transcripción inversa de ARN
- genotipado
- análisis proteómico,
- análisis de transcriptoma,
- cristalización, y en particular cristalización de proteínas,
- búsqueda y evaluación de objetivos farmacéuticos, logros farmacéuticos o derivaciones de productos

45

50

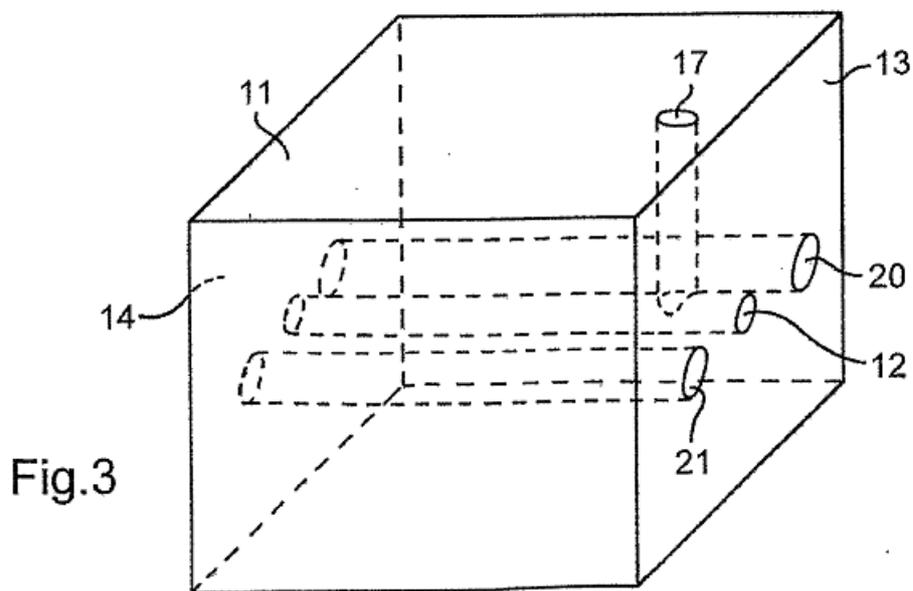
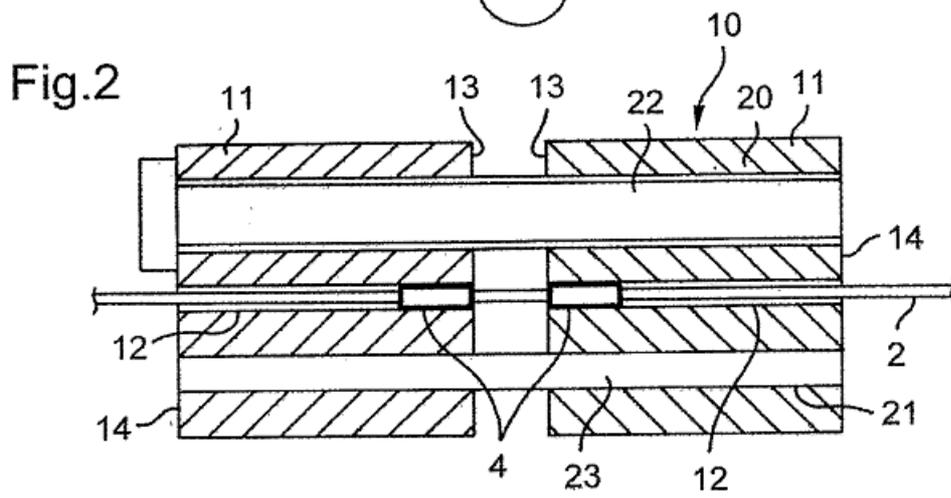
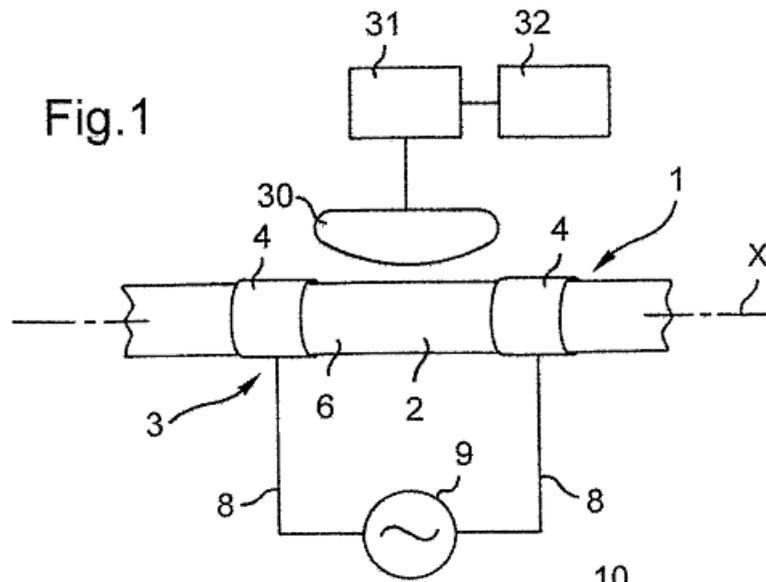
55

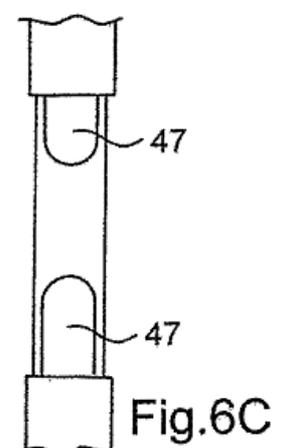
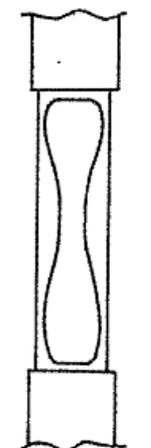
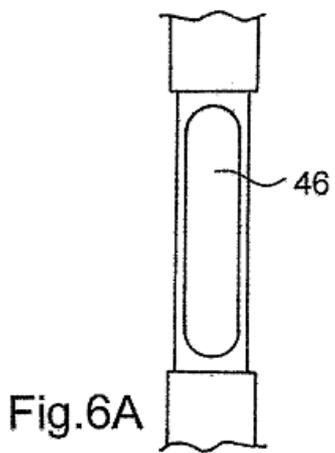
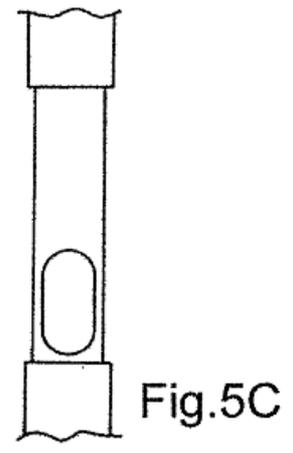
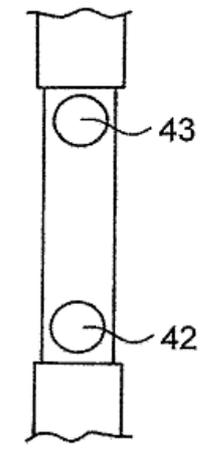
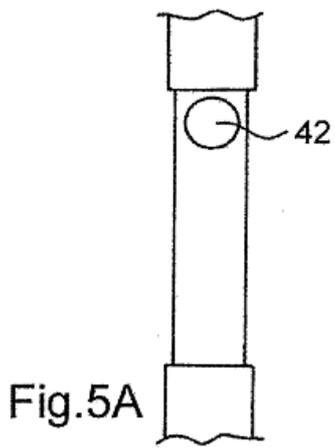
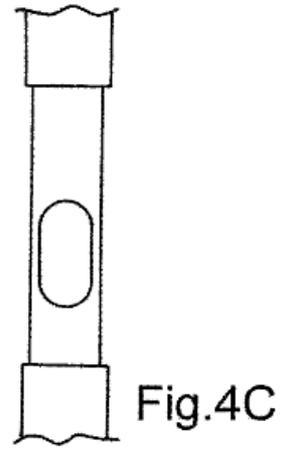
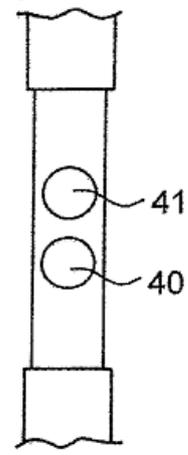
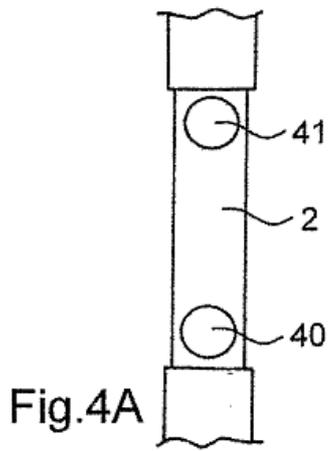
- farmacéuticos o de medicamentos,
- reacción enzima-proteína,
- 5
- reacción antígeno-anticuerpo,
 - selección de bibliotecas de productos químicos o biológicos,
- 10
- selección de alto rendimiento,
 - suministro de fármacos,
 - diagnóstico,
- 15
- análisis o lisis de al menos una célula viva o célula muerta,
 - análisis de microorganismos,
- 20
- reacción química,
 - reacción de reactivo-catalizador,
 - reacción de polimerización,
- 25
- fusión de partículas, por ejemplo, coloides, para formar una cadena,
 - preparación de coloides, emulsiones, vesículas, en particular objetos coloidales monodispersos,
- 30
- preparación de nanopartículas o micropartículas,
 - control ambiental,
 - detección de contaminantes,
- 35
- control de un proceso industrial.
- 40
- 45

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Método para deformar, en particular dividir, al menos una gota con base de agua, o para desplazar al menos dos gotas con base de agua entre sí, en particular para colapsar dichas gotas, en un microcanal (2) que tiene un eje longitudinal (X) y está lleno de aceite o un disolvente fluorado, comprendiendo dicho método:
- introducir la al menos una gota o las al menos dos gotas en el microcanal,
 - generar un campo eléctrico dentro de al menos una parte del microcanal, al menos cuando la al menos una gota o las al menos dos gotas se encuentran dentro de dicha parte del microcanal, siendo dicho campo eléctrico prácticamente colineal al eje del microcanal en dicha parte y que tiene una amplitud y una frecuencia elegida para deformar al menos una gota, o para desplazar unas hacia las otras, en el microcanal, de las al menos dos gotas,
- 10 El campo eléctrico generado por la manipulación de gotas significa que comprende:
- una unidad de generador (9), y
 - un conjunto de electrodos (3), que comprende al menos dos electrodos (4; 35) espaciados axialmente a lo largo del eje del microcanal en una distancia lo suficientemente larga como para que el campo eléctrico entre los electrodos sea prácticamente colineal al eje del microcanal, comprendiendo la unidad de generador al menos uno de entre un generador de corriente y un generador de tensión para crear una diferencia de potencial entre los electrodos (4; 35), en donde el conjunto de electrodos (3) está aislado eléctricamente de la superficie interior del microcanal.
- 15 **2.** Un método según la reivindicación precedente, en donde la al menos una parte del microcanal en donde el campo eléctrico es prácticamente colineal al eje (X) del microcanal tiene una longitud comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 veces el espesor de dicha parte, y preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 veces el espesor de dicha parte.
- 20 **3.** Un método según la reivindicación 1, en donde al menos uno de dichos electrodos (4; 35) comprende al menos dos partes equipotenciales enfrentadas entre sí a través del microcanal (2).
- 4.** Un método según la reivindicación 3, en donde al menos uno de dichos electrodos (4) tiene una superficie cilíndrica que rodea el microcanal.
- 25 **5.** Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en donde los electrodos (4; 35) están separados por un espacio (6) que tiene una longitud que es mayor que el espesor del microcanal, preferiblemente mayor que el doble del espesor del microcanal.
- 30 **6.** Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la unidad de generador es capaz de generar un campo continuo.
- 7.** Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la unidad de generador es capaz de generar un campo variable.
- 35 **8.** Un método según la reivindicación anterior, para hacer las gotas coalescentes, en donde la unidad de generador (9) es capaz de generar el campo eléctrico de corriente alterna con una frecuencia comprendida entre 100 Hz y 10 kHz.
- 40 **9.** Un método según la reivindicación 7, para dividir en partes alícuotas al menos una gota, en donde la unidad de generador (9) es capaz de generar el campo eléctrico de corriente alterna con una frecuencia inferior a 50 Hz.
- 10.** Un método según cualquier reivindicación precedente, estando el conjunto de electrodos aislado eléctricamente de una superficie interior del microcanal por un material aislante que tiene un espesor de al menos 1 nm, por ejemplo, al menos 10 nm, preferiblemente al menos 100 nm, y más preferiblemente de al menos 1 μm .
- 45 **11.** Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjunto de electrodos está aislado eléctricamente de una superficie interior del microcanal mediante un material aislante obtenido de material polimérico, óxido no conductor como, por ejemplo, vidrio, dióxido de silicio, diamante, cerámica no conductora.
- 50 **12.** Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos una de dichas gotas contiene material biológico.
- 55 **13.** Un método para utilizar el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para realizar al menos una de entre las operaciones de:
- 60
- 65

- mezcla,
- genotipado,
- 5 - análisis proteómico,
- análisis de transcriptoma,
- 10 - cristalización, y en particular cristalización de proteínas,
- búsqueda y evaluación de objetivos farmacéuticos, logros farmacéuticos o derivaciones de productos farmacéuticos o de medicamentos,
- 15 - reacción de enzima-proteína,
- reacción de antígeno-anticuerpo,
- selección de bibliotecas de productos químicos o biológicos,
- 20 - selección de alto rendimiento,
- suministro de medicamentos,
- diagnóstico,
- 25 - análisis o lisis de al menos una célula viva o una célula muerta,
- análisis de microorganismos,
- 30 - reacción química,
- reacción de reactivo-catalizador,
- reacción de polimerización,
- 35 - fusionar partículas, por ejemplo, coloides, para formar una cadena,
- preparación de coloides, emulsiones, vesículas, en particular objetos coloidales monodispersos,
- 40 - preparación de nanopartículas o micropartículas,
- control ambiental,
- detección de contaminantes,
- 45 - control de un proceso industrial.





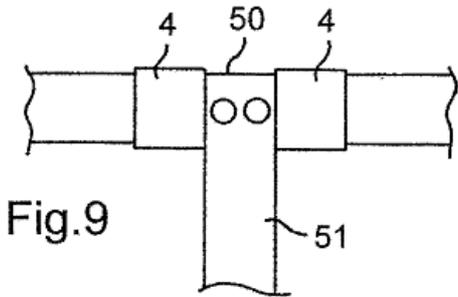
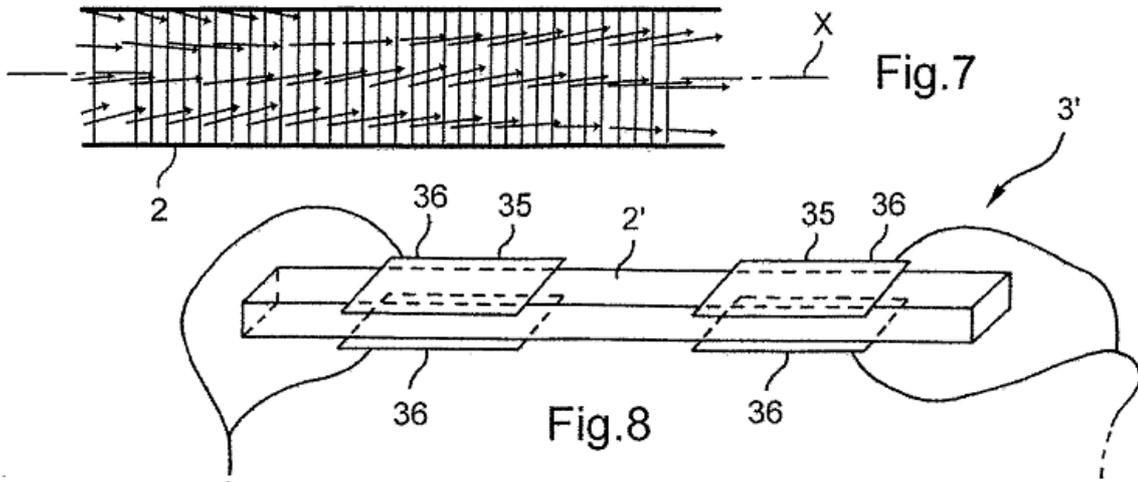


Fig. 9

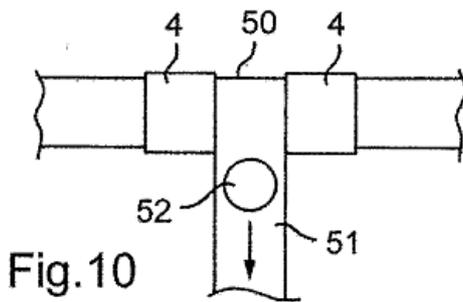


Fig. 10

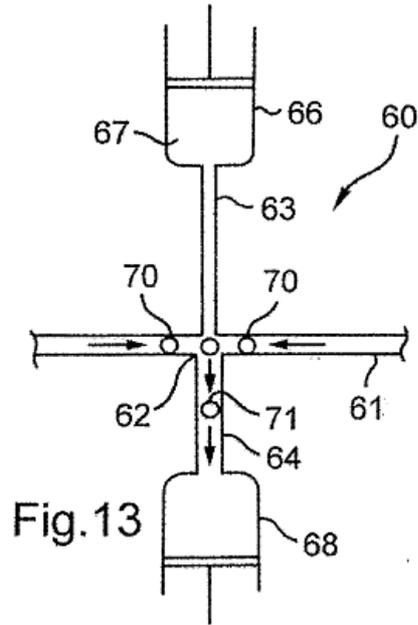


Fig. 13

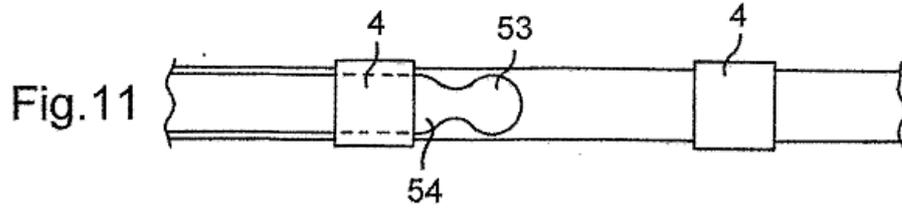


Fig. 11

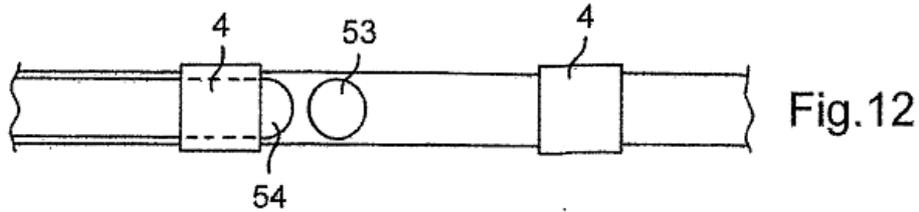


Fig. 12

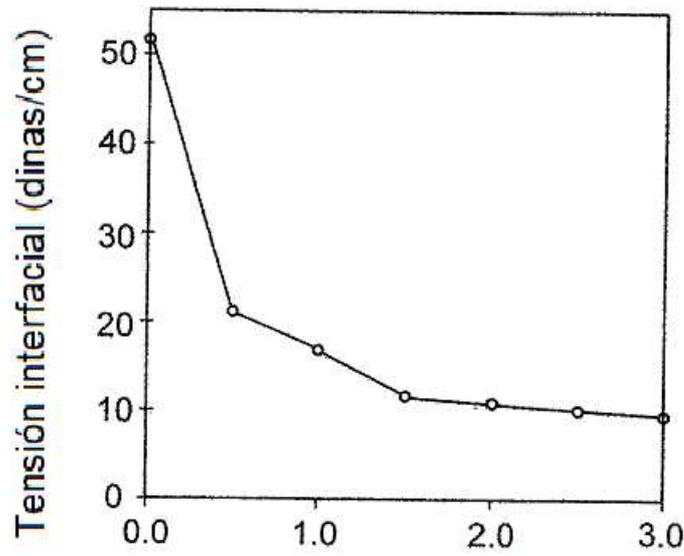


Fig.14

Masa porcentual de surfactante de fluoroalcohol en FC-40

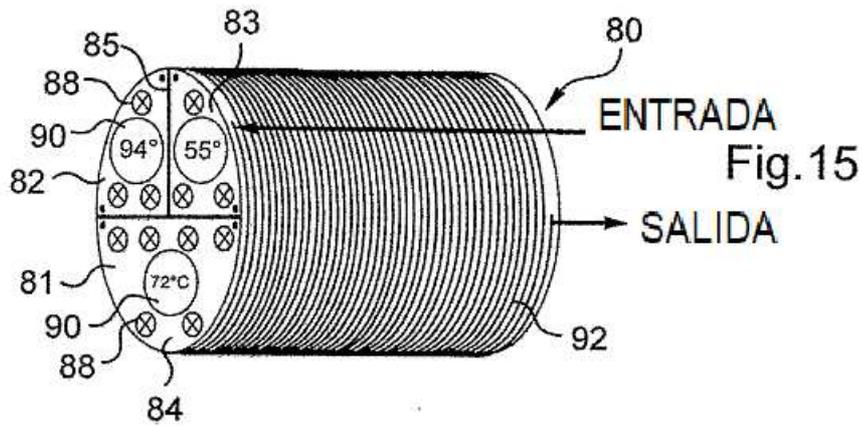


Fig.15

Fig.16

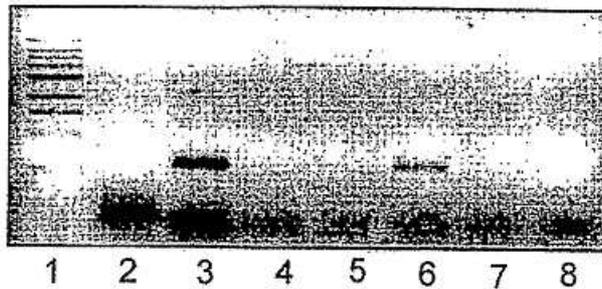
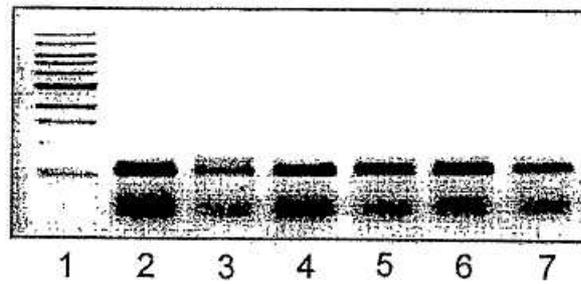


Fig.17

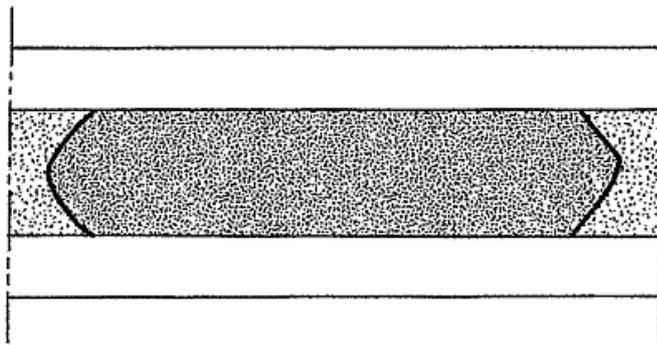


Fig.18a

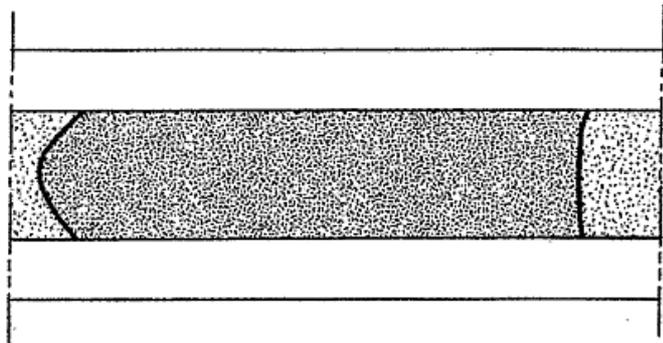


Fig.18b

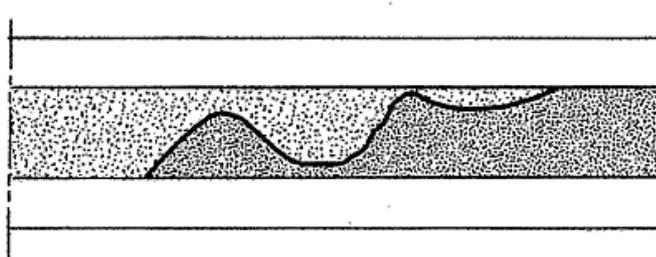


Fig.18c

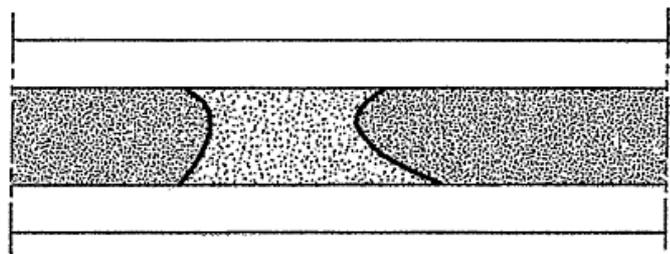


Fig.18d

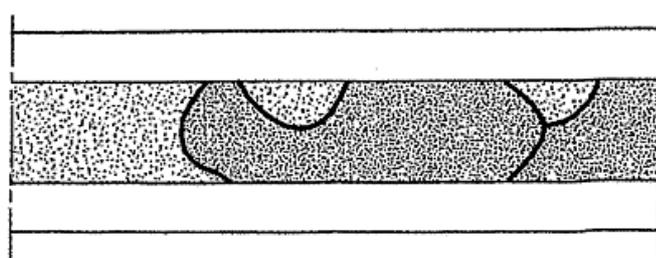


Fig.18e

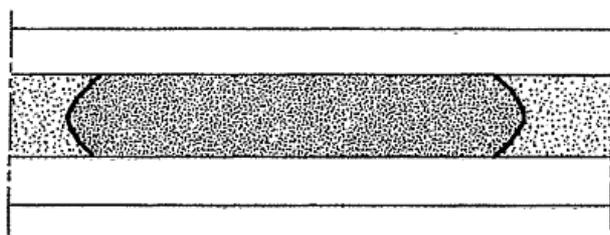


Fig.19a

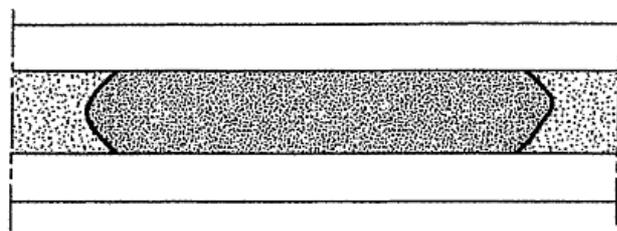


Fig.19b

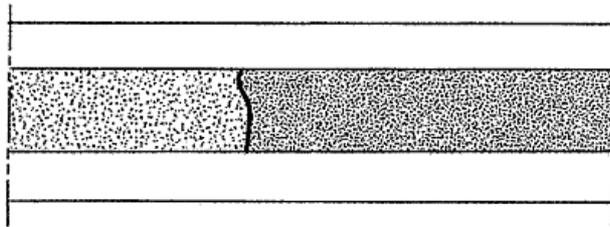


Fig.19c

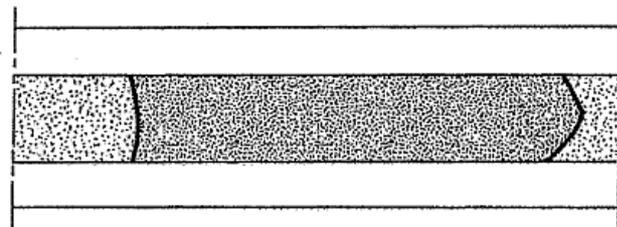


Fig.19d

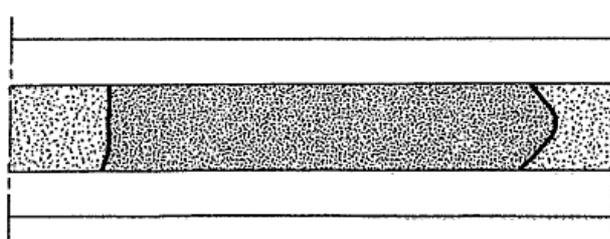


Fig.19e

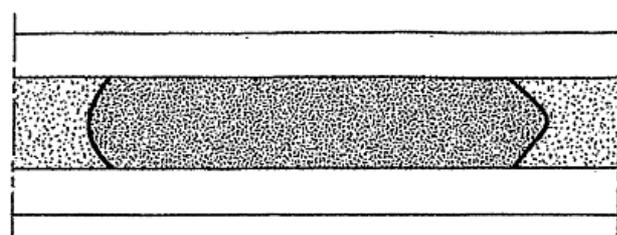


Fig.20a

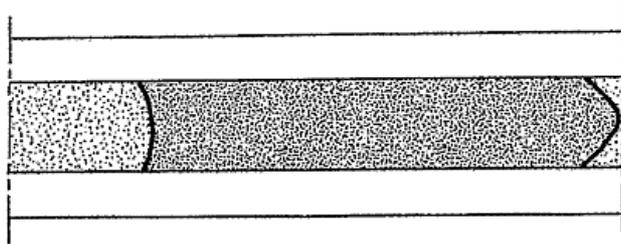


Fig.20b

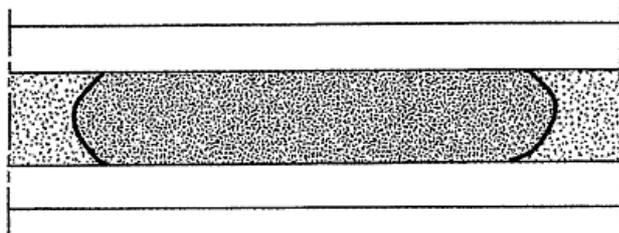


Fig.20c

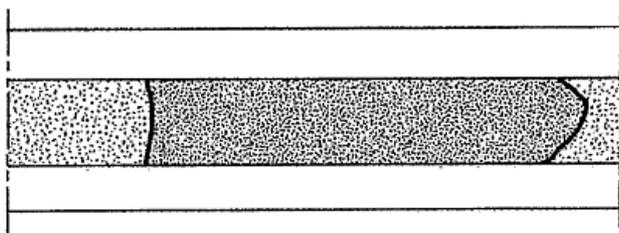


Fig.20d

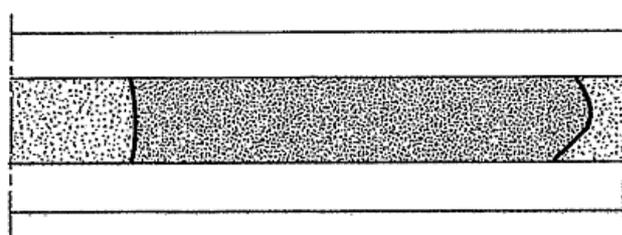


Fig.20e

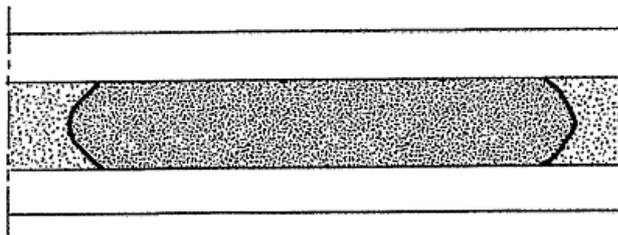


Fig.21a

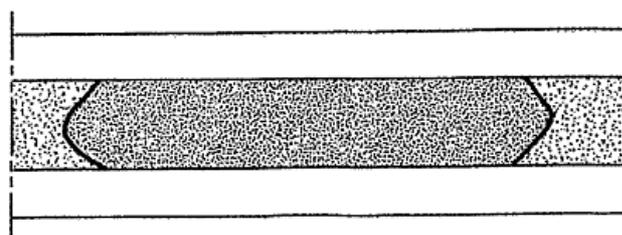


Fig.21b

Fig.22

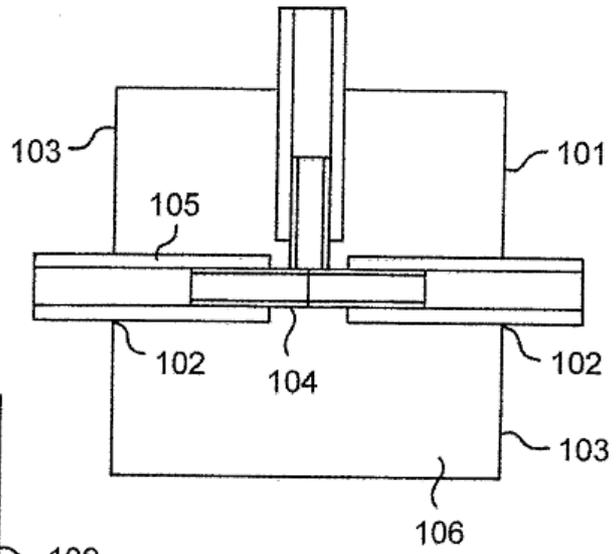


Fig.23

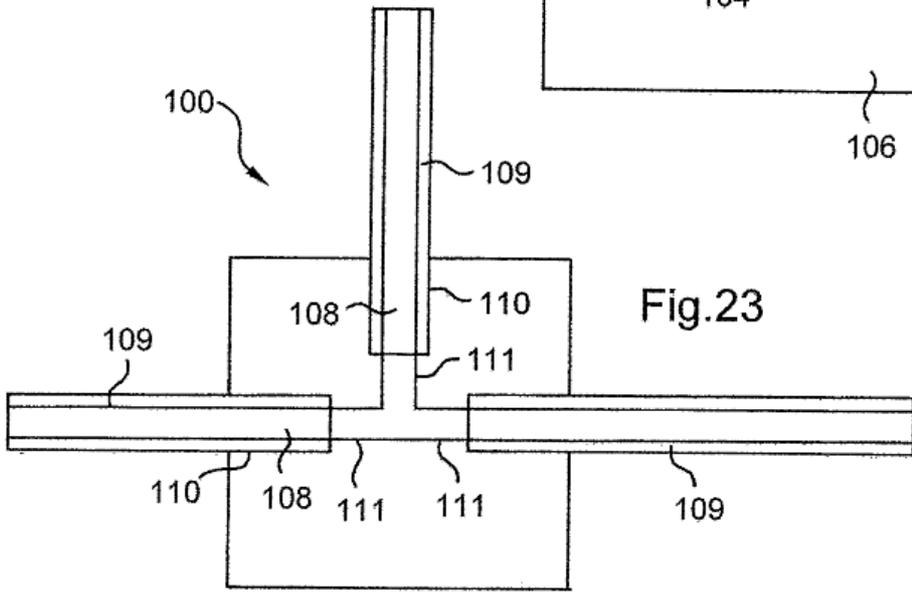


Fig.24

