

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 634**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01F 13/00 (2006.01)

B01F 15/02 (2006.01)

B01F 3/08 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2008.01)

B01F 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2015 PCT/EP2015/071435**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16087068**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2015 E 15763938 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3227023**

54 Título: **Procedimiento para generar gotas**

30 Prioridad:

02.12.2014 DE 102014224664

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

18.11.2020

73 Titular/es:

**HAHN-SCHICKARD-GESELLSCHAFT FÜR
ANGEWANDTE FORSCHUNG E.V. (100.0%)
Wilhelm-Schickard-Strasse 10
78052 Villingen-Schwenningen, DE**

72 Inventor/es:

**SCHWEMMER, FRANK y
SCHULER, FRIEDRICH**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 794 634 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

Procedimiento para generar gotas

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos para generar gotas de un primer líquido en un segundo líquido y, en particular, a procedimientos para generar gotas en la microfluídica centrífuga.
- [0002]** La microfluídica centrífuga se ocupa de la manipulación de líquidos en el intervalo comprendido entre femtolitros y mililitros en sistemas rotativos. Dichos sistemas son en su mayoría cartuchos de polímeros desechables
10 que se utilizan en o en lugar de rotores centrífugos con la intención de automatizar los procedimientos de laboratorio. Los procedimientos estándar de laboratorio, como pipeteo, centrifugación, mezcla o alícuota, se pueden implementar en un cartucho microfluídico. Para este propósito, los cartuchos contienen canales para guiar fluidos, así como cámaras para recolectar líquidos. Una secuencia predefinida de frecuencias de rotación, el llamado protocolo de frecuencia, se aplica a los cartuchos, para que los líquidos en los cartuchos puedan ser movidos por la fuerza
15 centrífuga.
- [0003]** La microfluídica centrífuga se utiliza principalmente en análisis de laboratorio y diagnóstico móvil. Dichos cartuchos pueden diseñarse como discos microfluídicos centrífugos, como se conocen con los nombres "Lab-on-a-disk", "LabDisk" y "Lab-on-CD", etc., que se utilizan en dispositivos de procesamiento especiales. Otros formatos,
20 como los tubos de centrifuga microfluídica, que se conocen, por ejemplo, con el nombre de "LabTube", se pueden utilizar en rotores de dispositivos de laboratorio estándar ya existentes.
- [0004]** Una operación básica esencial que debe llevarse a cabo en cartuchos microfluídicos centrífugos es la alícuota dirigida de un volumen de líquido en distintos subvolúmenes, las llamadas alícuotas. Para el uso de esta
25 operación básica en un posible producto, la consistencia y la simplicidad para aplicar el procedimiento es de suma importancia. Además, la operación básica deberá implementarse monóticamente, de modo que no se requieran componentes ni materiales adicionales que aumenten considerablemente los costes del cartucho debido a los costes de material o al ensamblaje adicional y la tecnología de conexión (ensamblaje).
- 30 **[0005]** Diversas aplicaciones, por ejemplo, PCR digital (reacción en cadena de la polimerasa), procedimientos unicelulares, recuento de bacterias mediante fagos fluorescentes y la producción de partículas en el intervalo de micrómetros, requieren la producción de una gran cantidad de alícuotas. Deben producirse entre cientos y más de un millón de alícuotas. Para muchas aplicaciones es importante crear alícuotas de pequeño tamaño (entre unos pocos microlitros y picolitros o femtolitros). Esto es en particular importante si se debe generar una cierta cantidad de
35 alícuotas para llevar a cabo un experimento deseado, pero el volumen inicial es limitado, p. ej., en la PCR digital. Los altos costes de los reactivos, la costosa purificación del material de muestra o pequeñas cantidades de material de muestra son a menudo una limitación para tales aplicaciones.
- [0006]** Por lo tanto, existe la necesidad de una operación básica para sistemas microfluídicos centrífugos que
40 permitan una alícuota específica de un volumen en muchas alícuotas (unos pocos cientos a más de un millón) de volúmenes pequeños (entre unos pocos microlitros y femtolitros). Se conoce una pluralidad de técnicas para la generación de gotas en plataformas microfluídicas y microfluídicas centrífugas impulsadas por presión.
- [0007]** El documento DE10361411 se refiere a un dispositivo mezclador y a un procedimiento para mezclar al
45 menos dos líquidos.
- [0008]** El documento WO2013/120190 se refiere a un procedimiento para mezclar dos fluidos en un dispositivo microfluídico.
- 50 **[0009]** Los procedimientos conocidos impulsados por presión para crear gotas de aceite a partir de una disolución acuosa utilizan un sistema de microcanales para emulsionar la disolución acuosa en aceite. La fase acuosa fluye a través de un canal hacia una cámara llena de aceite. Desplaza el aceite y fluye un nivel hacia una meseta. Esta meseta está dividida en canales por una serie de paredes. La fase acuosa fluye a través de estos canales a la meseta de atrás. A partir de ahí, la fase fluye hacia una cámara de atrás en la dirección del flujo y crea una emulsión mediante
55 el desprendimiento de gotas en el borde de la cámara. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en [6], [9] a [20] y [22].
- [0010]** [8] describe un procedimiento en el que la generación impulsada por presión y el transporte de burbujas de gas en líquidos tiene lugar a través de una altura de cámara cambiante. Tales procedimientos permiten la
60 producción de burbujas a partir de una fase gaseosa en una fase líquida mediante un sistema de microcanal. La fase gaseosa fluye a través de un canal hacia una cámara que se llena con la fase acuosa. La cámara está biselada para que su extremo plano esté en la boca del canal y sea tan alto como la altura del canal. Impulsada por la presión, la fase gaseosa fluye hacia la boca del canal, donde una burbuja empuja hacia la segunda fase. Debido a la cámara de ensanchamiento, las burbujas de un tamaño definido se desprenden de la lengua para líquidos y migran en la dirección
65 del flujo hacia la cámara, impulsadas por el ensanchamiento de la altura de la cámara y las fuerzas capilares.

[0011] [1] y [2] describen un procedimiento para la generación impulsada por presión y el transporte de gotas de líquido en líquidos a través de una altura de cámara cambiante. Este procedimiento permite generar gotas de una primera fase líquida en una segunda fase líquida con la ayuda de un sistema de microcanales. La primera fase fluye a través de un canal hacia una cámara que se llena con la segunda fase. La cámara está biselada para que su extremo plano esté en la boca del canal y sea tan alto como la altura del canal. Impulsada por una bomba, la primera fase fluye hacia la boca del canal, donde una lengua para líquidos empuja hacia la segunda fase. Debido a la cámara de ensanchamiento, las gotas de un tamaño definido se desprenden de la lengua para líquidos y migran en la dirección del flujo hacia la cámara, impulsadas por el ensanchamiento de la altura de la cámara y las fuerzas capilares.

[0012] Un procedimiento comparable se describe en [23]. Se describe un sistema operado por presión, es decir, no uno centrífugo, que presenta un dispositivo para generar gotas. El componente principal es un ensanchamiento para crear gotas. Después de un primer llenado con, p. ej., aceite se convierte en una segunda fase, p. ej., agua, emulsionada por fuerzas capilares en el ensanchamiento. El tamaño de las gotas se determina principalmente por la geometría del ensanchamiento. También se describe la paralelización mediante una disposición circular.

[0013] [3] y [7] describen un procedimiento para la generación centrífuga de gotas líquidas en el aire. Este procedimiento permite que se generen gotas de líquido en el aire con la ayuda de un sistema de microcanales y luego las gotas se recojan en una disolución acuosa. La primera fase líquida, impulsada por la fuerza centrífuga, fluye a través de un canal hacia un capilar, al final del cual hay una micro boquilla que cuelga libremente en el aire. A cierta frecuencia, caen al final del corte capilar, vuelan una corta distancia a través del aire circundante y luego golpean la superficie de un líquido en un recipiente colector. Allí las gotas se endurecen (parcialmente) a través de una reacción bioquímica y se recogen. El receptáculo se conecta de tal manera que en reposo es perpendicular al suelo y solo se coloca en posición horizontal al ejercer una fuerza centrífuga.

[0014] [5] describe un procedimiento para la generación centrífuga de volúmenes cerrados de líquido en un disco giratorio. Este procedimiento permite la creación de volúmenes líquidos cerrados con la ayuda de un microcanal y un sistema de microprofundización. Un primer líquido se coloca en una cámara de entrada de un sistema microfluídico en un disco giratorio. Mediante fuerza centrífuga, este líquido se mueve hacia una cámara con muchos pocillos pequeños que se llenan con el primer líquido. Se usa un segundo líquido inmiscible para desplazar el sobrenadante del primer líquido por encima de las paredes de los pocillos. Como resultado, se interrumpe el contacto directo entre sí de los volúmenes líquidos del primer líquido en los pocillos.

[0015] [4] y [21] describen dispositivos y procedimientos para producir una mezcla de dos fases mutuamente insolubles. Se proporciona un disco centrífugo microfluídico para generar gotas, donde la generación de gotas se basa en el principio de un flujo del manto. Un desprendimiento de gota de una fase acuosa de un primer canal se crea mediante constricción mediante un flujo de aceite de los canales adyacentes. Después de la confluencia de los canales adyacentes en el primer canal, el primer canal se ensancha y las gotas generadas entran en la sección ensanchada del primer canal.

[0016] La presente invención tiene por objeto proporcionar un procedimiento alternativo que permita de manera centrífuga generar una o varias gotas de un líquido que estén incrustadas en otro líquido.

[0017] Este objeto se logra mediante un procedimiento según la reivindicación 1.

[0018] Realizaciones ejemplares de la divulgación se explican con más detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos. Donde:

La figura 1 muestra esquemáticamente estructuras fluidicas en las que un canal de fluido se abre en una cámara de fluido en una sección radialmente exterior;

La figura 2 muestra esquemáticamente estructuras fluidicas en las que un canal de fluido se abre en una cámara de fluido en una sección radialmente interna;

Las figuras 3a a 3c muestran representaciones esquemáticas para explicar áreas de transición;

La figura 4 muestra diagramas esquemáticos que muestran la generación de gotas en una zona de transición;

Las figuras 5a a 5c muestran diagramas de distintos tamaños de gotas con cambios de parámetros del canal de fluido y la zona de transición;

La figura 6 muestra una ilustración esquemática de un dispositivo para generar gotas;

La figura 7 muestra una representación esquemática de emulsiones producidas;

La figura 8 muestra una ilustración esquemática de estructuras fluidicas para la generación de gotas combinadas con otras operaciones;

5 Las figuras 9a y 9b muestran representaciones esquemáticas de estructuras fluidicas para la generación paralela de varias gotas;

Las figuras 10a y 10b muestran representaciones esquemáticas de estructuras fluidicas para la generación paralela de varias gotas con distintas propiedades;

10 La figura 11 muestra una ilustración esquemática de realizaciones ejemplares alternativas de estructuras fluidicas;
y

Las figuras 12 y 13 muestran vistas laterales esquemáticas para explicar realizaciones ejemplares de dispositivos para generar gotas de una o varias gotas.

15 **[0019]** Antes de que las realizaciones ejemplares de la invención se expliquen con más detalle, primero debe señalarse que los ejemplos de la divulgación pueden usarse en particular en el campo de la microfluidica centrífuga, que se ocupa del procesamiento de líquidos en el intervalo comprendido entre femtolitros y mililitros. En consecuencia, las estructuras fluidicas pueden presentar dimensiones adecuadas en el intervalo de micrómetros para el manejo de
20 los volúmenes de líquido correspondientes. En particular, se pueden aplicar realizaciones ejemplares de la descripción a sistemas microfluidicos centrífugos, como se conoce, por ejemplo, bajo el nombre de "Lab-on-a-Disk".

[0020] Cuando se usa el término «radial» en la presente invención, se entiende radial con respecto a un centro de rotación sobre el cual se puede girar el cuerpo de rotación. En el campo centrífugo, una dirección radial se aleja radialmente del centro de rotación y una dirección radial aumenta radialmente hacia el centro de rotación. Un canal de fluido, cuyo comienzo está más cerca del centro de rotación que su extremo, disminuye radialmente, mientras que un canal de fluido, cuyo comienzo está más alejado del centro de rotación que su extremo, aumenta radialmente. Un canal que presenta una sección radialmente ascendente comprende componentes direccionales que se elevan radialmente o corren radialmente hacia adentro. Está claro que dicho canal no tiene que correr exactamente a lo largo
30 de una línea radial, sino que puede correr en ángulo a la línea radial o curva.

[0021] Cuando se hace referencia a un canal de fluido en la presente invención, significa una estructura cuya dimensión de longitud desde una entrada de fluido a una salida de fluido es mayor, por ejemplo, que más de 5 veces o que más de 10 veces más grande, que la dimensión o dimensiones que define o definen la sección transversal del
35 flujo. Por lo tanto, un canal de fluido puede presentar una resistencia de flujo para que se fluya a través de él desde la entrada de fluido a la salida de fluido. Por el contrario, una cámara de fluido en esta invención es una cámara que puede presentar dimensiones tales que no ocurra una resistencia de flujo relevante en ella.

[0022] Como entenderán los expertos en la materia, el término fase líquida como se usa en la presente invención también incluye líquidos que contienen componentes sólidos, tales como, p. ej., suspensiones y muestras biológicas.

[0023] Con referencia a las figuras 12 y 13, se describen primero ejemplos de sistemas microfluidicos centrífugos.

45 **[0024]** La figura 12 muestra un dispositivo con un módulo fluidoico 10 en forma de cuerpo giratorio, que presenta un sustrato 12 y una cubierta 14. El sustrato 12 y la cubierta 14 pueden ser circulares en vista en planta, con una abertura central, a través de la cual el cuerpo giratorio 10 puede unirse a una parte giratoria 18 de un dispositivo de accionamiento 20 a través de un dispositivo de fijación convencional 16. La parte giratoria 18 está montada de forma
50 giratoria en una parte estacionaria 22 del dispositivo de accionamiento 20. El dispositivo de accionamiento 20 puede ser, por ejemplo, una centrífuga convencional, que puede presentar una velocidad de rotación ajustable, o una unidad de CD o DVD. Se puede proporcionar un dispositivo de control 24, que está diseñado para controlar el dispositivo de accionamiento 20 para aplicar una rotación o rotaciones de distintas frecuencias de rotación al cuerpo giratorio 10. El dispositivo de control 24 puede, como es obvio para los expertos en la técnica, implementarse, por ejemplo, mediante
55 un dispositivo informático programado apropiadamente o un circuito integrado específico del usuario. El dispositivo de control 24 también puede diseñarse para controlar el dispositivo de accionamiento 20 en respuesta a las entradas manuales de un usuario para efectuar las rotaciones necesarias del cuerpo giratorio. En cualquier caso, el controlador 24 puede configurarse para controlar el dispositivo de accionamiento 20 para aplicar la rotación necesaria al cuerpo giratorio. Se puede usar una centrífuga convencional con solo un sentido de rotación como dispositivo de
60 accionamiento 20.

[0025] El cuerpo giratorio 10 presenta las estructuras fluidicas necesarias. Las estructuras fluidicas necesarias pueden estar formadas por pocillos y canales en la cubierta 14, el sustrato 12 o en el sustrato 12 y la cubierta 14. En realizaciones ejemplares, por ejemplo, se pueden formar imágenes de estructuras fluidicas en el sustrato 12, mientras
65 se forman aberturas de llenado y aberturas de ventilación en la cubierta 14. En el caso de realizaciones ejemplares,

el sustrato estructurado (incluidas las aberturas de relleno y las aberturas de ventilación) se dispone en la parte superior y la tapa se dispone en la parte inferior.

- 5 **[0026]** En una realización ejemplar alternativa mostrada en la figura 13, los módulos fluidicos 32 se introducen en un rotor 30 y, junto con el rotor 30, forman el cuerpo giratorio 10. Los módulos fluidicos 32 pueden presentar cada uno un sustrato y una cubierta, en los que a su vez se pueden formar las estructuras fluidicas correspondientes. Un dispositivo de accionamiento 20 controlado mediante el dispositivo de control 24 puede a su vez accionar el cuerpo giratorio 10 formado por el rotor 30 y los módulos fluidicos 32.
- 10 **[0027]** En las figuras 12 y 13, R denota un centro de rotación alrededor del cual se puede girar el módulo fluidico o el cuerpo giratorio.
- [0028]** En realizaciones ejemplares de la descripción, el módulo fluidico o el cuerpo giratorio que presenta las estructuras fluidicas se pueden formar a partir de cualquier material adecuado, por ejemplo, un plástico, tal como
 15 PMMA (polimetacrilato de metilo), PC (policarbonato), PVC (cloruro de polivinilo) o PDMS (polidimetilsiloxano), vidrio o similares. El cuerpo giratorio 10 puede considerarse una plataforma
 20 microfluidica centrífuga. En realizaciones preferidas, el módulo fluidico o el cuerpo giratorio pueden estar hechos de un termoplástico, tal como PP (polipropileno), PC, COP (polímero olefínico cíclico), COC (copolímero olefínico cíclico) o PS (poliestireno).
- [0029]** Las realizaciones ejemplares de estructuras fluidicas, que pueden formarse en un módulo fluidico 32 correspondiente o en un cuerpo giratorio 10 correspondiente, se describen a continuación con referencia a las figuras.
- 25 **[0030]** Como se muestra en las figuras 1 y 2, las estructuras fluidicas presentan una cámara de fluido 50, un canal de fluido 52 y una zona de transición 54. El cuerpo giratorio y, por lo tanto, las estructuras fluidicas pueden girar alrededor de un centro de rotación R. La cámara de fluido 50 está configurada para alojar un líquido, al que también se hace referencia en este documento como un segundo líquido. El segundo líquido puede ser aceite, por ejemplo. El canal de fluido 52 está configurado para suministrar un líquido, que también se denomina en este documento el primer
 30 líquido, a la zona de transición 54 y, por lo tanto, a la cámara de fluido 50 por una presión centrífuga hidrostática provocada por una rotación del cuerpo giratorio. El primer líquido puede ser, por ejemplo, una solución acuosa. Sin embargo, la divulgación no se limita a tales líquidos, sino que se puede implementar usando otros líquidos siempre que el primer y el segundo líquido, que preferentemente presentan densidades distintas, no sean miscibles.
- 35 **[0031]** La zona de transición 54 entre el canal de fluido 52 y la cámara de fluido 50 está diseñada de tal manera que un flujo del primer líquido, que es inmisible en el segundo líquido, a través del canal de fluido (52) en la dirección de la cámara de fluido, a causa de la rotación del sustrato y, por lo tanto, la presión centrífuga hidrostática resultante, provoca la formación de gotas del primer líquido incluídas en el segundo líquido. Solo el primer líquido fluye considerablemente. Las realizaciones ejemplares de la divulgación mostrada en las figuras 1 y 2 no contienen canales
 40 adicionales y tanto la cámara de fluido 50 como el canal de fluido 52 pueden ventilarse.
- [0032]** En la realización ejemplar mostrada en la figura 1, el canal de fluido 52 se abre en la cámara de fluido 50 en una región radialmente exterior. Esta realización está diseñada para que la densidad del primer líquido sea menor que la densidad del segundo líquido, es decir, la fase emulsionada sea más ligera que la fase circundante.
 45 Debido al campo centrífugo provocado por la rotación, las gotas más ligeras del primer líquido generado en la cámara de fluido 50 se elevan radialmente hacia adentro en esta realización ejemplar y se alejan de la zona de transición. Por lo tanto, la flotabilidad del campo centrífugo se puede usar para mover las gotas más ligeras lejos de donde se crearon y para mantener el segundo líquido en su lugar.
- 50 **[0033]** Una ventaja de la generación de gotas centrífugas es en particular que en realizaciones en las que el medio continuo, es decir, el segundo líquido, como, p. ej., el aceite es más denso que el primer líquido, p. ej., agua, el medio continuo se mantiene en el ensanchamiento mediante las fuerzas centrífugas. Esto es en particular ventajoso cuando se trata de producir emulsiones en las que la mayor cantidad posible de gotas esté contenida en la menor fase continua posible. El estado de la técnica menciona una proporción de un 96 % de volumen de caída y un 4 % de
 55 volumen de la fase continua. Con la ayuda de realizaciones ejemplares de la descripción, es posible mejorar considerablemente esta relación, a saber, 97,2 % de volumen de caída y 2,8 % de volumen de la fase continua, por ejemplo. Esto corresponde a un ahorro del 30 % de la fase continua y permite producir emulsiones de gel *in situ*.
- [0034]** En la realización ejemplar mostrada en la figura 2, el canal de fluido 52 se abre en la cámara de fluido 60 en una región radialmente interna. Esta realización está diseñada para que la densidad del primer líquido sea mayor que la densidad del segundo líquido, es decir, la fase emulsionada sea más pesada que la fase circundante. Debido al campo centrífugo provocado por la rotación, en esta realización ejemplar, las gotas más pesadas del primer líquido generado en la cámara de fluido 50 son impulsadas radialmente hacia afuera y se alejan de la zona de transición.
- 65 **[0035]** En contraste con las realizaciones ejemplares mostradas en las figuras 1 y 2, en las que el centro de

rotación se muestra por encima de las estructuras fluidicas, el centro de rotación también podría estar dispuesto debajo de las estructuras fluidicas, lo que da como resultado un canal recto que se abre en un extremo radialmente exterior de la cámara de fluido y un canal en ángulo que se abre en un extremo radialmente interno de la cámara de fluido.

5 **[0036]** Al girar el cuerpo giratorio, el primer líquido puede así emulsionarse de manera controlada en el segundo líquido. Como resultado, una gota del primer líquido puede incluirse en el segundo líquido o una pluralidad de gotas del primer líquido puede incluirse en el segundo líquido, en función del número de gotas según la duración de la rotación. En realizaciones de la divulgación, un volumen total del primer líquido que se suministra a través del canal de fluido se puede dividir en un gran número de gotas que están incluidas en el segundo líquido.

10

[0037] Con referencia a las figuras 3a a 3c, las realizaciones ejemplares de la zona de transición se explican ahora con más detalle. Las figuras 3a y 3b representan vistas superiores esquemáticas de las respectivas zonas de transición 54 y la figura 3c muestra vistas esquemáticas en sección longitudinal de las respectivas zonas de transición 54 (las secciones longitudinales pueden aplicarse a ambas estructuras mostradas en las figuras 3a y 3b). Una dirección de flujo es de izquierda a derecha en las figuras 3a a 3c y se representa mediante una flecha 55.

15

[0038] La zona de transición 54 presenta una primera zona de ensanchamiento 54a, donde la sección transversal del flujo para el flujo del primer líquido se ensancha en una primera dirección perpendicular a la dirección del flujo 55. La primera dirección puede corresponder, por ejemplo, a la dirección del ancho del canal de fluido. En otras palabras, el canal de fluido en la primera zona de ensanchamiento 54a se ensancha en una primera dimensión. Este ensanchamiento puede tener lugar repentinamente, es decir, de manera similar a un salto, véase la figura 3a, o al menos parcialmente de forma continua, véase el ensanchamiento 58 en la figura 3b. Como se puede ver en las figuras 3a y 3b, la sección transversal del flujo se ensancha preferentemente en primeras direcciones mutuamente opuestas, es decir, hacia la izquierda y la derecha con respecto a una línea central imaginaria 56 (longitudinal) del canal de fluido 52. El ensanchamiento en las primeras direcciones opuestas entre sí puede tener lugar simétricamente.

20

25

[0039] La zona de transición 54 también presenta una segunda zona de ensanchamiento 54b, la cual se dispone aguas abajo de la primera zona de ensanchamiento 54a y en la cual la sección transversal del flujo para el flujo del primer líquido se ensancha en una segunda dirección, que es perpendicular a la primera dirección y la dirección del flujo. La segunda dirección puede ser, por ejemplo, la dirección de altura del canal de fluido 52. En otras palabras, el canal se ensancha en una segunda dimensión en la segunda zona de ensanchamiento. El ensanchamiento en la segunda zona de ensanchamiento da como resultado un borde 61 (véase la figura 3c), que preferentemente se extiende sobre todo el ancho de la estructura obtenida por el ensanchamiento en la primera región de ensanchamiento.

30

35

[0040] Como se muestra en las figuras 3a y 3b mediante una distancia A, la zona de transición puede presentar una sección transversal constante de una sección, en la que el flujo del primer líquido entre la primera zona de ensanchamiento 54a y la segunda zona de ensanchamiento 54b ofrece una sección transversal de flujo constante. Esta zona puede denominarse terraza, ya que en esta zona el suelo de la cámara se eleva en comparación con el suelo de la cámara después de la segunda zona de ensanchamiento.

40

[0041] En las vistas en sección longitudinal esquemática I, II y III de la figura 3c se muestran realizaciones ejemplares de ensanchamientos en la segunda zona de ensanchamiento 54b. I muestra un ensanchamiento repentino 60, II muestra un ensanchamiento continuo 62 y III muestra un ensanchamiento repentino 60a. Además, en la realización ejemplar mostrada en III, se proporciona un ensanchamiento 64 en la segunda dirección en la primera zona de ensanchamiento 54a.

45

[0042] En general, la sección transversal del flujo se ensancha en la primera zona de ensanchamiento 54a en la primera dirección (o las primeras direcciones opuestas), donde el ensanchamiento puede tener lugar simultáneamente en otras direcciones, por ejemplo, la segunda dirección, donde el ensanchamiento en la otra dirección generalmente será menor que el ensanchamiento en la(s) primera(s) dirección(es). En general, la sección transversal del flujo en la segunda zona de ensanchamiento 54b se ensancha en la segunda dirección, donde el ensanchamiento puede tener lugar en otras direcciones al mismo tiempo. Por lo tanto, también se incluyen casos en los que el canal de fluido se abre hacia la cámara de fluido en un ángulo distinto al perpendicular.

50

55

[0043] En otras palabras, el canal de flujo 52 se abre hacia la cámara de fluido 50 en una posición X, es decir, en una zona 50a de la cámara de fluido, que representa la terraza. En la zona de la abertura, el canal se ensancha repentinamente, figura 3a, o continuamente, figura 3b, en la primera dimensión. Como se muestra en la figura 3c, la región 50a de la cámara de fluido presenta una altura constante. La región 50a ofrece así al flujo del primer líquido una sección transversal de flujo constante. Desde una posición Y en la dirección del flujo, la altura de la cámara de fluido 50 aumenta en el borde 61, como resultado de lo cual tiene lugar un ensanchamiento en la segunda dirección, a través del cual se forma una segunda región 50b de la cámara. Como se muestra en la figura 3c, este aumento puede ser repentino o continuo. La segunda zona de ensanchamiento 54b se implementa de este modo. Está claro que solo las zonas del canal de fluido 52 y la cámara de fluido 50 que son relevantes para la zona de transición se muestran en las figuras 3a a 3c.

60

65

[0044] En otras palabras, el canal de fluido 52 se encuentra con la cámara de fluido 50. El canal de fluido 52 se ensancha repentinamente o continuamente en al menos una dimensión. Al mismo tiempo, el canal de fluido 52 puede ensancharse repentinamente o continuamente en una segunda dimensión. El canal de fluido 52 preferentemente no se ensancha en la segunda dimensión al mismo tiempo. Si el canal de fluido se ensancha al mismo tiempo en la segunda dimensión, preferentemente se ensancha poco en comparación con el ensanchamiento simultáneo en la primera dimensión. La cámara de fluido 50 se ensancha desde el extremo desde el cual se suministra el canal de fluido 52 al otro lado. Este ensanchamiento puede tener lugar de forma repentina o continua. El ensanchamiento comienza después de una distancia A desde la transición desde el canal de fluido 52 a la cámara de fluido 50. El ensanchamiento se lleva a cabo preferentemente en una dirección perpendicular al ensanchamiento previo del canal de fluido en la abertura hacia la cámara de fluido. Se entiende que preferido significa que esto también puede tener lugar en otras direcciones.

[0045] Los inventores han reconocido que las estructuras fluídicas, comparables a las estructuras descritas para sistemas basados en presión, por ejemplo, en [6], [9] a [20] y [22], pueden usarse ventajosamente en un sistema centrífugo o una plataforma centrífuga.

[0046] Para la formación de las gotas, la cámara de fluido 50 y el canal de fluido 52 están provistos de una segunda fase líquida, es decir, un segundo líquido. Esta puede ocurrir, por ejemplo, por los efectos de una fuerza centrífuga provocada por una rotación de la estructura fluídica alrededor del centro de rotación R. Una primera fase líquida (en gran medida), que es inmiscible con la primera fase, se introduce posteriormente a través del canal de fluido 52.

[0047] La rotación del sustrato (es decir, el cuerpo giratorio), p. ej., debida a la presión centrífuga hidrostática, provoca el flujo de la primera fase líquida hacia la cámara de fluido 50. La rotación puede tener lugar a una velocidad de rotación constante. El flujo de la primera en la segunda fase líquida inmiscible a través de la fase descrita anteriormente conduce a un desprendimiento de gotas en el ensanchamiento en la segunda dimensión, es decir, el ensanchamiento en la segunda zona de ensanchamiento 54b. El volumen de las gotas generadas está esencialmente determinado por la geometría del ensanchamiento y la tensión superficial y las fuerzas capilares asociadas. El tamaño de la gota es en gran medida independiente del caudal de la primera fase. Esencialmente, solo fluye la primera fase líquida, mientras que la segunda fase líquida descansa esencialmente. Tanto la cámara de fluido 50 como todas las demás estructuras, como el canal de fluido 50, pueden tener una compensación de presión.

[0048] El diámetro de las gotas generadas es mayor que la dimensión de canal más pequeña de la transición. El campo gravitacional generado artificialmente por la rotación del cuerpo giratorio, que actúa sobre el líquido en la transición, puede corresponder en realizaciones a al menos dos veces la aceleración debida a la gravedad.

[0049] La figura 4 muestra cinco fases en la formación de una gota en el segundo ensanchamiento mediante el uso de estructuras fluídicas como se muestra en la figura 3b y en I en la figura 3c. Las estructuras fluídicas correspondientes se muestran en el área derecha de la figura 4. El parámetro A allí mostrado corresponde a la longitud de la terraza (es decir, la longitud de la zona de la misma sección transversal), el parámetro B corresponde al ancho del canal de fluido y el parámetro C corresponde a la profundidad del canal de fluido. Además, las secciones transversales respectivas a lo largo del canal (a lo largo de una línea q1) y las secciones transversales respectivas perpendiculares al canal (a lo largo de una línea q2) se muestran en la figura 4.

[0050] Al comienzo del procedimiento, la estructura fluídica se llena con el segundo líquido 67, por ejemplo, aceite. En la fase 1, el primer líquido 66 se suministra de manera centrífuga a través del canal de fluido 52. En la fase 2, el primer líquido 66 alcanza el primer ensanchamiento 58 y se extiende en la dirección del ancho. En la fase 3, el primer líquido 66 alcanza el segundo ensanchamiento 50 y también se extiende en la dirección vertical. Esta propagación continúa en la fase 4 hasta que una gota 70 en el campo centrífugo se desprende en la fase 5.

[0051] Las figuras 5a a 5c muestran cómo los distintos parámetros afectan el tamaño de la gota, donde una fase acuosa se utiliza como el primer líquido y el aceite como el segundo líquido. La figura 5a muestra cómo un cambio en la profundidad del canal de fluido C afecta al tamaño de la gota. La figura 5b muestra cómo un cambio en la longitud de la terraza A afecta al tamaño de la gota. La figura 5c muestra cómo un cambio en la frecuencia de rotación afecta al tamaño de la gota.

[0052] Los inventores han descubierto que las buenas medidas para producir gotas de tamaño mediano son las siguientes: A = entre 75 mm y 125 mm, en particular 100 mm; B = entre 70 mm y 110 mm, en particular 90 mm; y C = entre 45 mm y 75 mm, en particular 60 mm. El ángulo del primer ensanchamiento fue de 45 °, pero se puede cambiar. El ángulo del segundo ensanchamiento fue de 90 °, pero también se puede bajar. La profundidad de la cámara de fluido (es decir, la cámara de recogida de gotas) fue de 200 mm.

[0053] Los inventores han descubierto que el ensanchamiento en la primera zona de ensanchamiento debe ser al menos 1,1 veces el ancho del canal. Los inventores también descubrieron que al menos un ensanchamiento de 1,1

veces también debería tener lugar en la segunda zona de ensanchamiento.

[0054] Como se puede ver en la figura 5a, el tamaño de gota aumenta linealmente con la profundidad del canal C. Los tamaños de gota mostrados en la figura 5a se obtuvieron con una longitud de terraza A de 100 mm y un ancho de canal B de 90 mm.

[0055] Como se puede ver en la figura 5b, una variación de la longitud de la terraza A distingue tres subáreas de la curva. Si la terraza es considerablemente más corta que el ancho del canal, la longitud de la terraza es irrelevante para el diámetro de caída. Si la terraza se alarga, el diámetro de caída aumenta con la longitud de la terraza A (según la teoría de la potencia $2/3$). Si la terraza es muy larga en comparación con la profundidad del canal C, las gotas se desprenden en la terraza y el diámetro de la gota permanece aproximadamente igual. En algunos casos, se producen gotas satélite, como lo muestra una gota con un diámetro de aprox. 150 mm y una longitud de terraza de 500 mm. Los resultados mostrados en la figura 5b se obtuvieron con un ancho de canal constante B de 90 mm y una profundidad de canal constante C de 60 mm.

[0056] La figura 5c muestra el tamaño de gota con una variación de la presión para una estructura constante con un ancho de canal B de 90 mm, una profundidad de canal C de 60 mm y una longitud de terraza A de 100 mm. Se cambió la presión de la fase acuosa con respecto a la fase oleosa en la abertura del canal de fluido hacia la cámara de fluido, donde este cambio se logró cambiando la frecuencia de rotación. Como se puede ver en la figura 5c, el tamaño de la gota en el área medida no depende de la frecuencia de rotación y, por lo tanto, tampoco de la presión.

[0057] La figura 6 muestra esquemáticamente una realización ejemplar de un dispositivo para llevar a cabo un procedimiento correspondiente, donde el dispositivo se muestra en un estado, donde una pluralidad de gotas 70 de un primer líquido 72, que se suministra a través de un canal de fluido 52, se genera en un segundo líquido 74, que se dispone en una cámara de fluido 50. Una zona de entrada del canal de fluido 52 puede conectarse de forma fluida a una cámara de entrada 100. Una vista superior ampliada 102 y una sección longitudinal ampliada 104 de la zona de transición 54 también se muestran en la figura 6. Un módulo fluido que presenta estructuras fluidicas correspondientes puede, por ejemplo, insertarse en un rotor como un cartucho 106, como se muestra esquemáticamente en la figura 6.

[0058] Las realizaciones ejemplares de las estructuras fluidicas según la descripción permiten la generación microfluidica centrífuga de gotas con poco esfuerzo manual. En las secciones A a F de la figura 7 se muestran imágenes microscópicas (vistas superiores) de cámaras de fluido en las que se han generado gotas de distintos tamaños. Estas gotas fueron creadas con estructuras fluidicas de dimensiones distintas. Más precisamente, las gotas se crearon con canales de fluido de secciones transversales distintas, por lo que lo siguiente se aplica a la sección transversal (tamaño): $A < B < C < D < E < F$. Con solo dos etapas de pipeteo, todas las gotas podrían generarse en menos de un minuto a una frecuencia de rotación sin cambios, lo cual es una clara ventaja en comparación con los sistemas actualmente utilizados que se basan en bombas de jeringa.

[0059] Las realizaciones de la divulgación se basan además en el hallazgo de que la generación de gotas en una plataforma microfluidica centrífuga se puede combinar fácilmente con otras operaciones en la misma plataforma microfluidica centrífuga. Por ejemplo, una extracción de ADN con posterior purificación de ADN y posterior mezcla con componentes para la amplificación de ADN y la posterior división en alícuotas en muchas gotas pequeñas y la posterior amplificación digital del ADN en las alícuotas, puede implementarse con una manipulación mínima y bajo riesgo de contaminación utilizando la formación de gotas descrita en este documento.

[0060] Por lo tanto, las realizaciones ejemplares de la divulgación también son en particular adecuadas para procedimientos en relación con reacciones de detección bioquímica dividiendo el analito en N particiones. En tales procedimientos, el analito se diluye hasta tal punto que al menos una partición y un máximo de N-1 no contienen analito. Al contar las particiones llenas de analito, la concentración del analito se puede calcular de nuevo utilizando su distribución de Poisson. El analito (primer líquido) se puede dividir según esto mediante la formación de gotas como se describe en la presente invención.

[0061] Por ejemplo, utilizando la formación de gotas descrita en la presente invención, los inventores realizaron con éxito por primera vez una RPA de gotas digital (RPA = amplificación mediante recombinasa y polimerasa, del inglés *Recombinase Polymerase Amplification*). Al hacerlo, se añadió una mezcla de RPA disponible comercialmente a moléculas diana de ADN diluidas disponibles comercialmente y se dividió en muchas gotas distintas (volúmenes de reacción) en aceite. Como con las gotas mostradas en la figura 7, esto se hizo con dos etapas de pipeteo y frecuencia de rotación sin cambios. No se realizaron cambios en la composición de los reactivos comerciales. Las gotas en la estructura microfluidica se expusieron a continuación a una temperatura constante para permitir una reacción enzimática (RPA). La intensidad de fluorescencia también se leyó en la estructura microfluidica usando un escáner de fluorescencia disponible comercialmente.

[0062] En realizaciones ejemplares adicionales, las estructuras fluidicas pueden integrarse en un módulo fluido a un tamaño que corresponda esencialmente al de un portaobjetos de microscopio (aprox. 25 x 75 mm²). Al

insertar el módulo fluidoico en una centrífuga (por ejemplo, una centrífuga de mesa), se pueden crear gotas en un área del tamaño del portaobjetos.

[0063] En realizaciones ejemplares adicionales, las estructuras fluidoicas pueden integrarse en un módulo fluidoico en una placa de microtitulación, por ejemplo, una placa de 96 pocillos. Al insertar el módulo fluidoico en una centrífuga, se pueden generar gotas en pocillos individuales de la placa. En una realización ejemplar adicional, las estructuras fluidoicas del módulo fluidoico están integradas en un inserto para una placa de microtitulación. Al insertar el módulo fluidoico en una centrífuga, se generan gotas en los pocillos individuales de la placa. Después de que se hayan generado las gotas, el inserto se puede quitar de la placa de microtitulación y las gotas se pueden usar para aplicaciones posteriores, como, por ejemplo, una PCR.

[0064] En realizaciones ejemplares, las gotas pueden contener una mezcla de reacción bioquímica que es adecuada para la detección de ADN, por ejemplo, una mezcla de PCR o varias mezclas de amplificación isotérmica, como p. ej., RPA (amplificación mediante recombinasa y polimerasa), RCA (amplificación en círculo rodante, del inglés *Rolling Circle Amplification*), LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle, del inglés *Loop-mediated Isothermal Amplification*) o varias mezclas para la detección de ADN no isotérmico. Además, algunas gotas pueden contener moléculas de ADN que deben detectarse. El módulo fluidoico completo donde se forman las estructuras fluidoicas pueden presentar un tamaño estandarizado. Todo el módulo fluidoico puede ser, p. ej., expuesto a varias temperaturas con dispositivos convencionales, llamados ciclos de deslizamiento, para permitir una reacción de detección de ADN (por ejemplo, PCR, RPA, RCA, LAMP). Esta reacción de detección puede, p. ej., detectarse a partir de un tinte fluorescente que se puede leer después o durante la reacción a través de un sistema óptico. Debido al tamaño estandarizado, esto puede, p. ej., llevarse a cabo en un llamado escáner de diapositivas. Para este propósito, partes del sistema pueden hacerse transparentes. También es posible controlar la temperatura del módulo fluidoico durante todo el procedimiento, p. ej., para evitar la activación prematura de enzimas por bajas temperaturas. Se entiende que los procedimientos de amplificación isotérmica significan procedimientos de amplificación que tienen lugar a una temperatura constante.

[0065] Las realizaciones ejemplares proporcionan un dispositivo en el que la estructura de formación de gotas en una plataforma microfluidica centrífuga está conectada a una estructura microfluidica centrífuga que permite la extracción y/o purificación de ADN antes de que el ADN se mezcle con una mezcla de reacción bioquímica, la cual permite la detección del ADN en base a, por ejemplo, una PCR u otros, por ejemplo, métodos de amplificación isotérmicos o no isotérmicos. Por ejemplo, se puede agregar una PCR digital o RPA digital. Un ejemplo de las estructuras fluidoicas correspondientes se muestra en la figura 8. En una plataforma microfluidica centrífuga, una entrada 130 está conectada a través de un canal 132 a las estructuras 134 para la extracción y/o purificación de ADN 134. En términos de flujo ascendente o descendente, el sistema puede conectarse a través de un canal 136 a otras estructuras 138 para etapas de manipulación automatizadas (por ejemplo, preamplificación o generación de doble gota, por ejemplo, con preamplificación intermedia). Estas estructuras 138 o las estructuras para la extracción y/o purificación de ADN 134 están conectadas a través de un canal de fluido 52 a una transición 54 para la generación de gotas y una cámara de fluido 50. Por lo tanto, la generación de gotas puede conectarse a otras operaciones fluidoicas a través de canales y a una entrada, lo que permite, por ejemplo, la extracción de ADN, purificación de ADN, preamplificación de ADN y a continuación la PCR digital (o procedimiento de detección isotérmica digital) automatizadas.

[0066] En realizaciones alternativas, también se pueden determinar y detectar otros ácidos nucleicos en lugar de ADN, como, p. ej., ARN (ácido ribonucleico).

[0067] Con referencia a las figuras 9 y 10, a continuación se explican realizaciones ejemplares mediante las cuales se puede aumentar la velocidad de producción de gotas al conectar una pluralidad de estructuras de producción en paralelo, de modo que se puede generar una pluralidad de gotas simultáneamente.

[0068] La figura 9a muestra estructuras fluidoicas en las que cada uno de una pluralidad de canales de fluido 152 se abre en una cámara de fluido 154 en una zona de transición 154 correspondiente. Los canales de fluido 152 están conectados de manera fluida a un canal de suministro común 162 a través de una estructura de distribuidor 160. En lugar de un canal de suministro, también podría proporcionarse una pluralidad de canales de suministro, donde es posible que un primer subconjunto de los canales de fluido se conecte a un primer canal de suministro a través de un primer canal de distribución y un segundo subconjunto de los canales de fluido se conecte a un segundo canal de suministro a través de un segundo canal de distribución. Los canales de fluido se abren en la sección radialmente interna de la cámara de fluido, de modo que las estructuras fluidoicas son adecuadas para un primer líquido que presente una densidad mayor que el segundo líquido. Las regiones de transición 154 presentan una estructura idéntica, de modo que se pueden generar gotas del mismo tamaño en paralelo.

[0069] La figura 9b muestra estructuras fluidas similares, pero los canales de fluido se abren en la cámara de fluido en una sección radialmente exterior de la misma, de modo que las estructuras fluidas son adecuadas para un primer líquido que presente una densidad menor que el segundo líquido.

- 5 **[0070]** Así, las realizaciones ejemplares crean un módulo fluídico que es giratorio alrededor de un centro de rotación R, en el que un canal de suministro 162 está acoplado a un canal de distribución 160, desde el cual se ramifica una pluralidad de canales de fluido 152, que se transportan a través de una pluralidad de transiciones 154 en una cámara de fluido 150. Las transiciones 154 entre la cámara de fluido 150 y los canales de fluido 152 a su vez están diseñadas de tal manera que el flujo de un primer líquido, que es inmiscible en el segundo líquido, a través de los canales en la dirección de la cámara de fluido, a causa de la rotación del módulo fluídico y una presión hidrostática resultante, provoca la formación de gotas del primer líquido incluidas en el segundo líquido. Solo la primera fase fluye considerablemente.
- 10 **[0071]** Las figuras 10a y 10b muestran estructuras fluídicas que son similares a las de las figuras 9a y 9b. Sin embargo, las transiciones en las figuras 10a y 10b se dimensionan de manera distinta, de modo que se forman gotas de tamaños distintos. Esto se indica en las figuras 10a y 10b, en que las transiciones se traman de manera distinta, donde solo dos transiciones se designan con los números de referencia 154a y 154j simplemente a modo de ejemplo. En otras realizaciones ejemplares, se pueden producir gotas de tamaños distintos en paralelo. Las realizaciones de la presente descripción crean así un módulo fluídico que es giratorio alrededor de un centro de rotación R, en el que un canal de suministro 162 está acoplado a un canal de distribución 160, desde el cual se ramifica una pluralidad de canales de fluido 152. Los canales de fluido 152 se transportan a una cámara de fluido 150 a través de una pluralidad de transiciones estructuralmente similares 154a, 154j que son distintas en sus dimensiones. Las transiciones 154a, 154j entre la cámara de fluido y el canal de fluido están diseñadas de tal manera que el flujo de un primer líquido, que es inmiscible en el segundo líquido, a través de los canales de fluido en la dirección de la cámara de fluido, a causa de la rotación del módulo fluídico y una presión hidrostática resultante del mismo, provoca la formación de gotas de tamaños distintos del primer líquido incluidas en el segundo líquido. Solo la primera fase fluye considerablemente. Así, se pueden generar gotas con tamaños distintos pero definidos, por ejemplo, en un cartucho con una frecuencia de rotación.
- 15 **[0072]** En general, en el caso de realizaciones ejemplares de la descripción, solo se requiere un canal de fluido para generar una gota, el cual se abre en una cámara de fluido en una zona de transición. En realizaciones ejemplares adicionales, uno o varios canales pueden unir líquidos poco antes de o en la transición. Esto permite que las sustancias se mezclen inmediatamente antes de que se generen gotas. Esto también permite la generación dirigida de gotas anisotrópicas, p. ej., la producción de partículas de Janus o similares. Las posibles estructuras fluídicas para fusionar al menos dos canales antes de la generación de gotas se muestran en la figura 11. En las estructuras fluídicas izquierdas, dos canales 52 y 52a se encuentran en una transición común 54, la cual crea gotas que se mueven hacia una cámara 50. Se pueden proporcionar uno o varios canales adicionales, los cuales converjan con los canales 52 y 52a, como se indica mediante un canal opcional 52b en líneas discontinuas. En el caso de las estructuras fluidas correctas, un canal adicional 52c se abre en un canal principal 52 antes de una transición 54 que genera gotas. Uno o varios canales adicionales 52d, 52e también pueden abrirse en el canal principal 52, como se indica en líneas discontinuas. Los canales de apertura 52c, 52d, 52e pueden abrirse en el canal principal 52 en la misma ubicación y/o en ubicaciones distintas.
- 20 **[0073]** En realizaciones ejemplares adicionales, se pueden producir gotas de una primera fase que estén incluidas en una segunda fase y contengan una tercera fase que es inmiscible con la primera fase. Estas pueden ser, por ejemplo, gotas de una suspensión, p. ej., células o cuentas. Además, p. ej., gotas de una emulsión. Al menos una de las fases se puede endurecer (parcialmente) en una etapa posterior. Como resultado es posible la producción de partículas de Janus, p. ej., para encapsular dispositivos médicos.
- 25 **[0074]** En realizaciones adicionales, se pueden producir gotas, algunas de las cuales contienen bacterias. Estas bacterias pueden detectarse mediante una reacción de detección (p. ej., fagos fluorescentes) y detectarse mediante un procedimiento de detección adecuado (p. ej., medición de fluorescencia). Esto permite la cuantificación absoluta de bacterias viables, por ejemplo, para el diagnóstico de sepsis.
- 30 **[0075]** En realizaciones ejemplares adicionales, las gotas pueden contener componentes para llevar a cabo una reacción de inmunoensayo (inmunoensayo), la cual haga posible detectar antígenos o anticuerpos. Si el número de gotas se ajusta de modo que ni todas o ninguna gota contenga los antígenos o anticuerpos correspondientes, se puede realizar la detección digital de antígenos o anticuerpos (p. ej., ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción, del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)) digital, que, entre otras cosas, permite una cuantificación absoluta de antígenos o anticuerpos.
- 35 **[0076]** Los inventores han reconocido que los sistemas conocidos para generar gotas, como se describió al principio, presentan numerosas desventajas.
- 40 **[0077]** En el caso de los sistemas microfluídicos impulsados por presión para la división en alícuotas para generar gotas, se requiere un sistema externo para generar una presión adecuada. Esto presenta una serie de desventajas. Por ejemplo, se requieren dispositivos generadores de presión para operar los sistemas microfluídicos impulsados por presión que no sean dispositivos estándar, por lo que se requieren sistemas caros y especializados para cada aplicación. En función de la versión, el funcionamiento de estos sistemas es complejo porque, por ejemplo,
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

deberá garantizarse una conexión estrecha entre el sistema y el cartucho para generar las gotas. Las soluciones técnicas a este problema son concebibles, pero aumentan el grado de especialización y los costes. Las fluctuaciones de presión en los sistemas para aumentar la presión solo pueden minimizarse a altos costes y dan lugar a dificultades en el funcionamiento de los sistemas. La operación básica de alicuotar en sistemas impulsados por presión solo se

5 puede combinar con otras operaciones básicas con gran esfuerzo. Un sistema monolítico concebible que, por ejemplo, automatice la extracción de ADN, la purificación de ADN y la PCR digital, sería difícil de realizar impulsado por presión o sería muy complicado de operar, lo que dificultaría su uso en situaciones estándar. En general, los sistemas impulsados por presión son caros, están sujetos a fluctuaciones de presión debido a la pulsación y se caracterizan por una integración compleja.

10 **[0078]** Los sistemas microfluídicos centrífugos previos para la alícuota también presentan numerosas desventajas. Por ejemplo, la formación de gotas que vuelan a un receptáculo a través del aire ambiente está limitada por una serie de desventajas. El sistema solo se puede usar de forma limitada para otros líquidos, ya que el endurecimiento (parcial) de las gotas es esencial para el funcionamiento del sistema. La contaminación del medio

15 ambiente y/o las gotas no pueden descartarse durante el contacto con el aire ambiente. La operación básica de alicuotar en estos sistemas solo se puede combinar con otras operaciones básicas con gran esfuerzo. Un sistema monolítico concebible que, por ejemplo, automatice la extracción de ADN, la purificación de ADN y la PCR digital, sería difícil de realizar o sería muy complicado de operar, lo que dificultaría su uso en situaciones estándar. Además, usando tales procedimientos, es muy difícil producir gotas, en particular pequeñas.

20 **[0079]** En los sistemas microfluídicos de alícuotas basados en micropocillos, la creación de alícuotas en pocillos en un disco giratorio está limitada por una serie de desventajas. Existen grandes dificultades en el procesamiento posterior (procesamiento aguas abajo) de las alícuotas, p. ej., es esencial para la formación de partículas de Janus para dispositivos médicos. El espacio requerido para los pocillos es relativamente alto, ya que no se pueden organizar

25 en tres dimensiones y las paredes rígidas entre los pocillos tienen un cierto ancho que es mayor que la distancia entre las gotas compactas.

[0080] Los inventores también han reconocido que en el procedimiento descrito en [4] y [21] el principio físico subyacente de la separación de gotas depende en gran medida de los caudales del aceite y la fase a emulsionar.

30 Dado que los caudales no pueden controlarse con precisión al principio y al final del procedimiento, esto conduce a caídas no homogéneas al principio y al final del procedimiento. Además, dado que se requiere un flujo constante de la fase oleosa para generar las gotas, se requiere una gran cantidad de aceite para producir la emulsión. Además, dichos sistemas anteriores requieren al menos tres canales para generar las caídas, lo que conduce a un mayor requisito de espacio en el disco en comparación con un solo canal, como se requiere en las realizaciones ejemplares

35 de la divulgación. Además, la adaptación a otros volúmenes de caída con esta estrategia requiere un rediseño completo de las estructuras. En el sistema presentado en la presente invención, esencialmente solo se debe ajustar el diámetro de un solo canal.

[0081] Las desventajas mencionadas con respecto al estado de la técnica pueden eliminarse en gran parte o

40 completamente mediante la estrategia descrita. Según la invención, las fuerzas impulsoras generadas centrífugamente pueden usarse para desprender una gota. La diferencia de densidad entre dos líquidos inmiscibles puede usarse para crear una emulsión. Además, la técnica según la invención es ventajosa porque el campo centrífugo que se usa para la generación de gotas se puede usar simultáneamente para alejar las gotas generadas del punto de formación y mantener la fase circundante en el punto de formación de gotas. Por ejemplo, las gotas pueden ser guiadas lejos de

45 la abertura del canal de fluido en la cámara de fluido mediante fuerzas de flotabilidad generadas centrífugamente. Se pueden usar fuerzas de flotabilidad artificiales para retener el segundo líquido en la abertura del canal de fluido en la cámara de fluido, como resultado de lo cual se pueden lograr altas relaciones agua/aceite en la emulsión. Las realizaciones solo requieren un canal que conduzca a una cámara para una formación de gotas correspondiente.

50 **[0082]** Además, en contraste con los procedimientos usados actualmente más comúnmente para generar gotas, no se requieren fuentes de presión externas según la invención, lo que reduce la susceptibilidad a errores y los costes. A diferencia del estado de la técnica, la presente invención se puede operar con dispositivos de laboratorio estándar (por ejemplo, centrífugas de mesa). Además, es fácilmente posible desarrollar y construir dispositivos apropiados para campos de aplicación especiales. Mediante la estrategia de la invención, la manipulación puede

55 simplificarse considerablemente en comparación con el estado de la técnica, ya que, por ejemplo, solo se requiere una etapa de pipeteo y una operación en un dispositivo de laboratorio estándar. El riesgo de contaminación puede reducirse. Las realizaciones ejemplares se pueden cargar con solo una a unas pocas etapas de pipeteo. Una división en alícuotas posterior puede automatizarse fácilmente usando la estrategia según la invención. La estrategia según la invención simplifica, con respecto al estado de la técnica, la combinación de alícuotas y otras etapas del procedimiento,

60 como, p. ej., la extracción y purificación de ADN. Además, la cantidad de fase circundante utilizada puede reducirse considerablemente en contraste con el estado de la técnica. A diferencia del estado de la técnica, la estrategia según la invención es capaz de alicuotar o emulsionar todo el volumen de muestra sin volumen muerto. Además, permite manipulaciones posteriores (manipulaciones aguas abajo) del volumen de muestra alicuotado. Además, las gotas generadas pueden dividirse nuevamente mediante centrifugación rápida y combinarse para formar un volumen total.

65 Esto es, para algunas aplicaciones, p. ej., secuenciación o preamplificación, necesario y muy engorroso de

implementar en sistemas impulsados por presión, por ejemplo mediante la adición de productos químicos.

[0083] La estrategia de solución según la invención usa un sistema en gran parte pasivo, cuyo único grado de libertad (frecuencia de rotación) puede usarse para controlar muchos otros procedimientos previos. A diferencia de los sistemas operados por presión, no hay problemas de inicio, es decir, se pueden producir gotas homogéneas desde el principio hasta el final. Además, la estrategia según la invención permite un ajuste simple de los caudales a través del protocolo de frecuencia.

[0084] Las realizaciones de la divulgación permiten la generación centrífuga de gotas líquido-líquido a partir de dos fases líquidas, donde esencialmente fluye solo una fase. Las realizaciones ejemplares requieren solo un canal de fluido, el cual conduce a la cámara de fluido, para generar una gota a la vez, donde es posible que se proporcione una pluralidad de canales para producir una pluralidad de gotas en paralelo. Las realizaciones ejemplares permiten la detección digital de moléculas diana (por ejemplo, amplificación de ADN) en el cuerpo giratorio. Las realizaciones ejemplares crean un sustrato que presenta una cámara que está conectada a un canal de fluido, donde la transición del canal de fluido a la cámara está diseñada de tal manera que después de que la cámara se haya llenado con una segunda fase líquida (por ejemplo, aceite), el flujo de una primera fase líquida no inmiscible en la primera (por ejemplo, agua), causada por la rotación del sustrato (debido a la presión centrífuga hidrostática), genera gotas (por lo que esencialmente solo una de las dos fases fluye durante la formación de la gota). El diámetro de las gotas generadas puede ser mayor que la dimensión de canal más pequeña de la transición.

[0085] Las realizaciones ejemplares de la divulgación crean así una estructura microfluídica para generar gotas dentro de un cartucho microfluídico, el cual se opera centrifugamente. Si las gotas se generan adecuadamente, solo el líquido a separar fluye considerablemente. El corte y el volumen de caída están determinados principalmente por las fuerzas capilares, las fuerzas de flotabilidad, la tensión superficial y la geometría de la zona de transición (geometría de la boquilla). El volumen de las gotas generadas es en gran medida independiente del caudal y la presión.

[0086] Aunque algunos aspectos se describen en este documento en relación con un dispositivo y la funcionalidad de un dispositivo, está claro que estos aspectos también proporcionan una descripción de un procedimiento correspondiente. Del mismo modo, está claro que algunos aspectos que se han descrito en relación con un procedimiento también se relacionan con una descripción de un dispositivo que está diseñado para proporcionar la funcionalidad que corresponde al procedimiento.

Bibliografía

[0087]

[1] Dangla, Remi; Fradet, Etienne; Lopez, Yonatan; Baroud, Charles N. (2013): The physical mechanisms of step emulsification, in: *Journal of Physics D: Applied Physics* 46 (11), S. 114003

[2] Dangla, Remi; Kayi, S. Cagri; Baroud, Charles N. (2013): Droplet microfluidics driven by gradients of confinement, in: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 [3], S. 853-858. DOI: 10.1073/pnas.1209186110

[3] Haeberle, Stefan; Naegele, Lars; Burger, Robert; Stetten, Felix von; Zengerle, Roland; Ducree, Jens (2008): Alginate bead fabrication and encapsulation of living cells under centrifugally induced artificial gravity conditions, in: *J Microencapsul* 25 (4), S. 267-274. DOI: 10.1080/02652040801954333

[4] Haeberle, Stefan; Zengerle, Roland; Ducree, Jens (2007): Centrifugal generation and manipulation of droplet emulsions, in: *Microfluidics and Nanofluidics* 3 (1), S. 65-75

[5] Kan, Cheuk W.; Rivnak, Andrew J.; Campbell, Todd G.; Piech, Tomasz; Rissin, David M.; Mösl, Matthias et al. (2012): Isolation and detection of single molecules on paramagnetic beads using sequential fluid flows in microfabricated polymer array assemblies, in: *Lab Chip* 12 (5), S. 977-985. DOI: 10.1039/c2lc20744c

[6] Kawakatsu, Takahiro; Kikuchi, Yuji; Nakajima, Mitsutoshi (1997): Regular-sized cell creation in microchannel emulsification by visual microprocessing method, in: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (3), S. 317-321

[7] Mark, Daniel; Haeberle, Stefan; Zengerle, Roland; Ducree, Jens; Vladisavljevic, Goran T. (2009): Manufacture of chitosan microbeads using centrifugally driven flow of gel-forming solutions through a polymeric micronozzle, in: *Journal of colloid and interface science* 336 (2), S. 634-641

[8] Metz, Tobias; Paust, Nils; Zengerle, Roland; Koltay, Peter (2010): Capillary driven movement of gas bubbles in tapered structures, in: *Microfluidics and Nanofluidics* 9 (2-3), S. 341-355

[9] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Iwamoto, Satoshi; Seki, Minoru (2001): Interfacial tension driven

monodispersed droplet formation from microfabricated channel array, in: Langmuir 17 (18), S. 5562-5566

- 5 [10] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Kuma- zawa, Naoyuki; Iwamoto, Satoshi; Seki, Minoru (2002a): Characterization of spontaneous transformation-based droplet formation during microchannel emulsification, in: The Journal of Physical Chemistry B 106 (36), S. 9405-9409
- 10 [11] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Oda, Tat- sua; Satake, Mitsuo; Seki, Minoru (2004): Effect of interfacial tension on the dynamic behavior of droplet formation during microchannel emulsification, in: Journal of colloid and interface science 269 (1), S. 178-185
- [12] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Seki, Minoru (2002): Effect of Channel Structure on Microchannel Emulsification, in: Langmuir 18 (15), S. 5708-5712. DOI: 10.1021/la025813a
- 15 [13] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Seki, Minoru (2002): Prediction of droplet diameter for microchannel emulsification, in: Langmuir 18 (10), S. 3854-3859
- [14] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Seki, Minoru (2002): Preparation of monodispersed polymeric microspheres over 50 nm employing microchannel emulsification, in: Industrial & engineering chemistry research 41 (16), S. 4043-4047
- 20 [15] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Seki, Minoru (2004): Prediction of droplet diameter for microchannel emulsification: prediction model for complicated microchannel geometries, in: Industrial & engineering chemistry research 43 (26), S. 8233-8238
- 25 [16] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Tong, Ji- hong; Nabetani, Hiroshi; Seki, Minoru (2000): Preparation of monodispersed solid lipid microspheres using a microchannel emulsification technique, in: Journal of colloid and interface science 227 (1), S. 95-103
- 30 [17] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Ushijima, Hideki; Yamamoto, Koji; Seki, Minoru (2001b): Preparation Characteristics of Monodispersed Water-in-Oil Emulsions Using Microchannel Emulsification, in: Journal of chemical engineering of Japan 34 (6), S. 757-765
- [18] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Yamamo- to, Koji; Iwamoto, Satoshi; Oda, Tatsuya; Satake, Mitsuo; Seki, Minoru (2004): Preparation characteristics of water-in-oil-in-water multiple emulsions using microchannel emulsification, in: Journal of colloid and interface science 270 (1), S. 221-228
- 35 [19] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Seki, Minoru (2002): Preparation of monodispersed emulsion with large droplets using microchannel emulsi- fication, in: JOACS, Vol. 79, No. 5
- 40 [20] Sugiura, Shinji; Nakajima, Mitsutoshi; Itou, Hit- satsugu; Seki, Minoru (2001): Synthesis of polymeric microspheres with narrow size distributions employing microchannel emulsification, in: Macromol. Rapid Commun. 2001, 22, No. 10, Seiten 773 - 778, Wi- ley-VCH Verlag GmbH, D-69451 Weinheim.
- 45 [21] DE 10 2005 048 259 A1
- [22] US 6 387 301 B1
- [23] US 2013/0078164 A1

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una o varias gotas de un primer líquido en un segundo líquido inmiscible con el primer líquido mediante un dispositivo para generar una o varias gotas de un primer líquido en un segundo líquido inmiscible con el primer líquido, donde el dispositivo presenta las siguientes características:

un cuerpo giratorio (10) que presenta estructuras fluídicas, donde las estructuras fluídicas presentan las siguientes características:

10 una cámara de fluido (50, 150) configurada para contener el segundo líquido;
 un canal de fluido (52, 152) que se abre en la cámara de fluido (50, 150) y está configurado para hacer que el primer líquido fluya en una dirección de flujo hacia la cámara de fluido (50, 150); y
 una zona de transición (54, 154, 154a, 154j) en la que el canal de fluido (52, 152) se abre en la cámara de fluido (50, 150), donde la zona de transición (54, 154, 154a, 154j) presenta una primera zona de ensanchamiento (54a), en la que la sección transversal del flujo para el flujo del primer líquido se ensancha en al menos una primera dirección perpendicular a la dirección del flujo, y presenta una segunda zona de ensanchamiento (54b), en la que la sección transversal del flujo para el flujo del primer líquido se ensancha en una segunda dirección, que es perpendicular a la dirección del flujo y a la primera dirección, donde la segunda zona de ensanchamiento (54b) se dispone aguas abajo de la primera zona de ensanchamiento (54a); y

20 un dispositivo de accionamiento (22), que está configurado para aplicar una rotación al cuerpo giratorio (10) de modo que el primer líquido se suministre de manera centrífuga a la cámara de fluido (50, 150), y que debido a la segunda zona de ensanchamiento (54b), se produzcan fuerzas de presión, fuerzas de flotación y fuerzas capilares inducidas hidrodinámicamente centrífugamente, las cuales provocan un desprendimiento de gota en el primer líquido, de modo que se genera una gota del primer líquido incluida en el segundo líquido,
 25 donde el dispositivo está diseñado para generar una gota de un primer líquido con una primera densidad en un segundo líquido con una segunda densidad, donde a) la primera densidad es mayor que la segunda densidad y el canal de fluido (52, 152) se abre en la cámara de fluido (50, 150) en una región radialmente interna, o b) la segunda densidad es mayor que la primera densidad y el canal de fluido (52, 152) se abre en la cámara de fluido (50, 150)
 30 en una región radialmente externa,

donde el procedimiento presenta las siguientes características:

35 rotación del cuerpo giratorio (10) para suministrar centrífugamente el primer líquido a través del canal de fluido (52, 152) a la cámara de fluido (50, 150), donde se introduce el segundo líquido, y para controlar la fuerza de presión, la fuerza de flotación y la fuerza capilar generadas centrífugamente que actúan sobre el primer líquido en la segunda zona de ensanchamiento, de tal manera que se produzca un desprendimiento de gota del primer líquido, de modo que se genere una gota del primer líquido incluida en el segundo líquido.
 40 donde después de generarse la gota, la gota se aleja mediante rotación de la zona de transición (54, 154, 154a, 154j) debido a las distintas densidades del primer líquido y el segundo líquido.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se usa un canal de fluido (52, 152) que se abre en la cámara de fluido (50, 150) en una región radialmente externa, y en el que se usa un segundo líquido que presenta una densidad mayor que el primer líquido, y en el que la fuerza centrífuga que actúa sobre el segundo líquido lo retiene en
 45 la zona de transición (54, 154, 154a, 154j).

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el primer líquido presenta una mezcla de reacción bioquímica que es adecuada para una detección de ADN o ARN.

50 4. Procedimiento según la reivindicación 3, que comprende además realizar una reacción de detección de ADN o una reacción de detección de ARN de la mezcla de reacción bioquímica y una lectura de un resultado de la reacción.

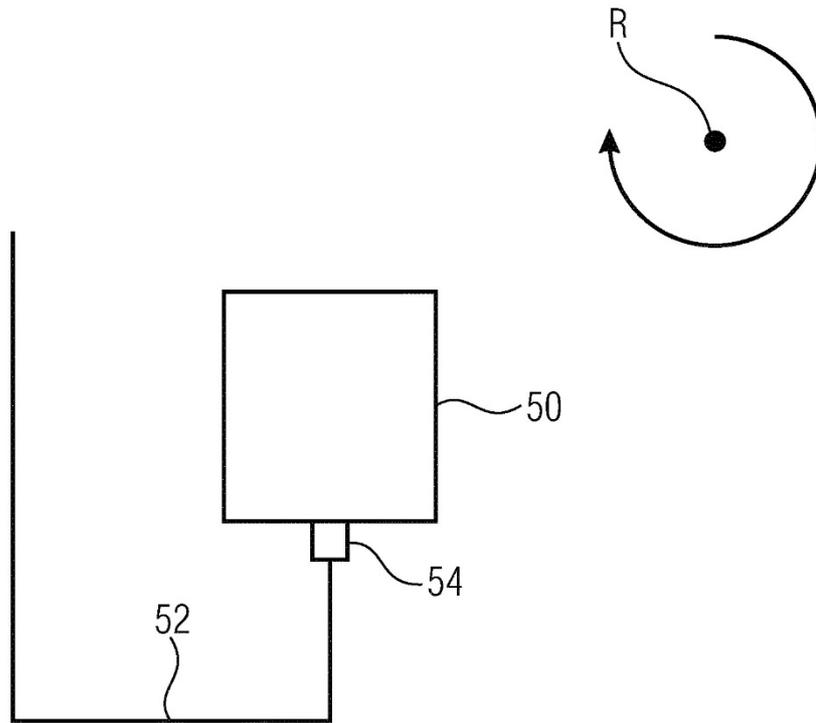


FIG 1

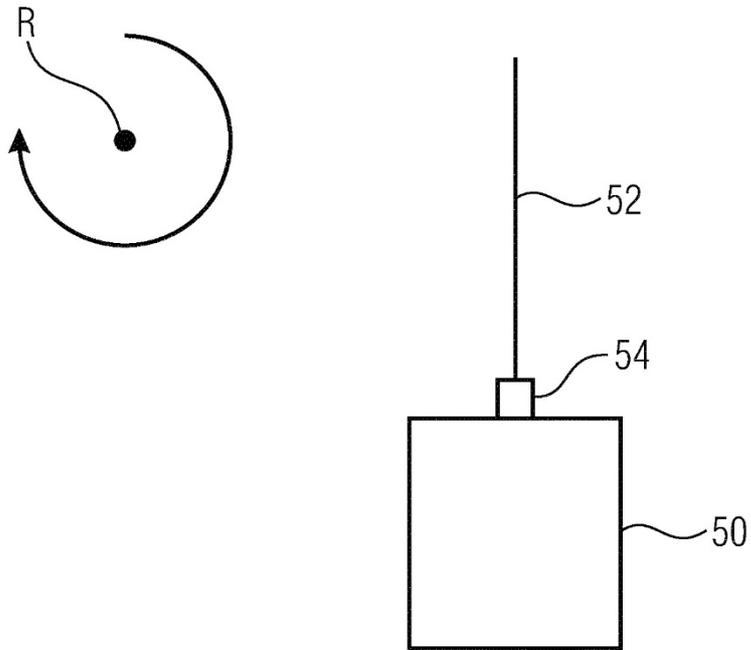
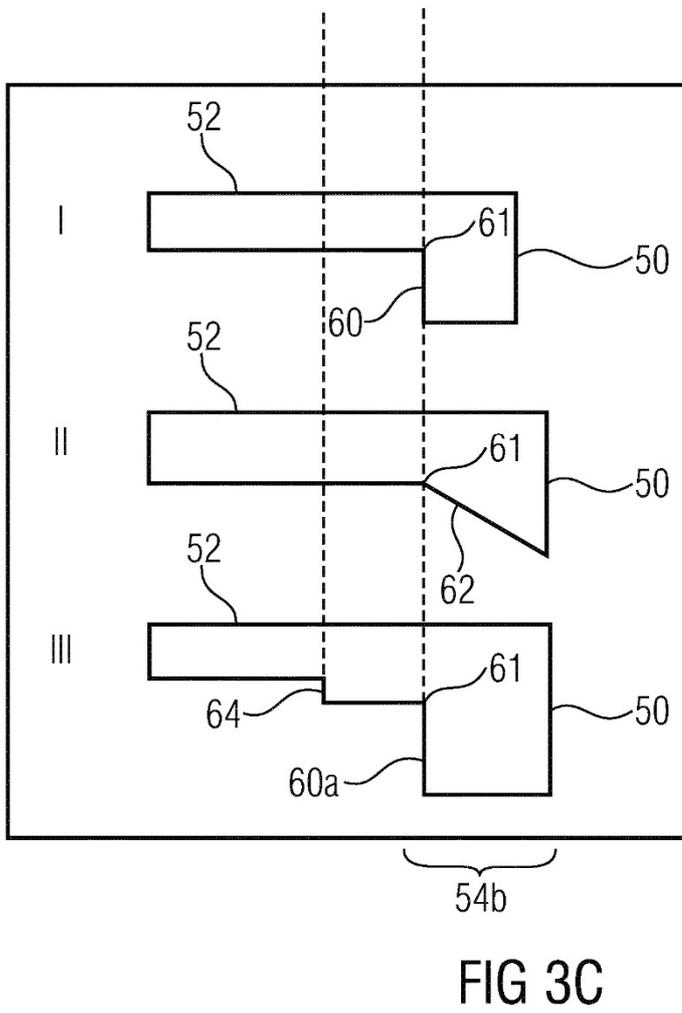
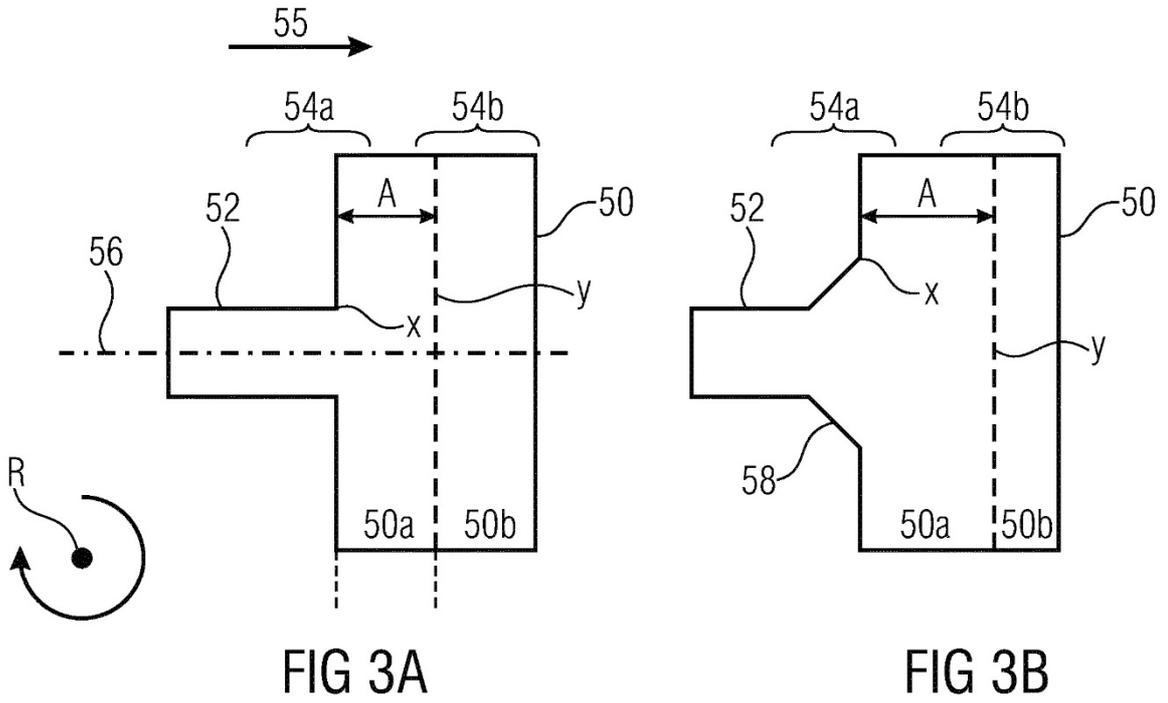


FIG 2



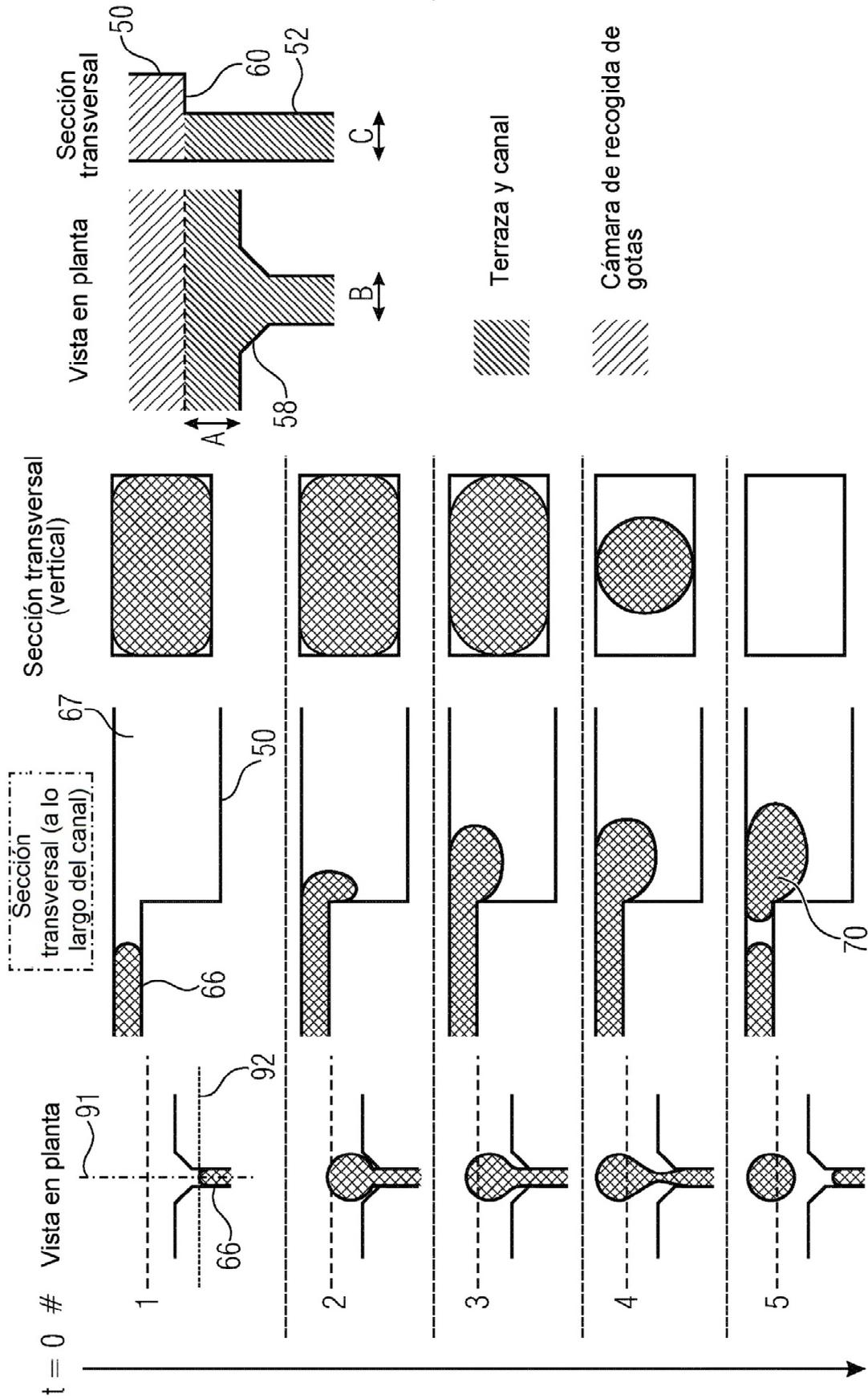


FIG 4

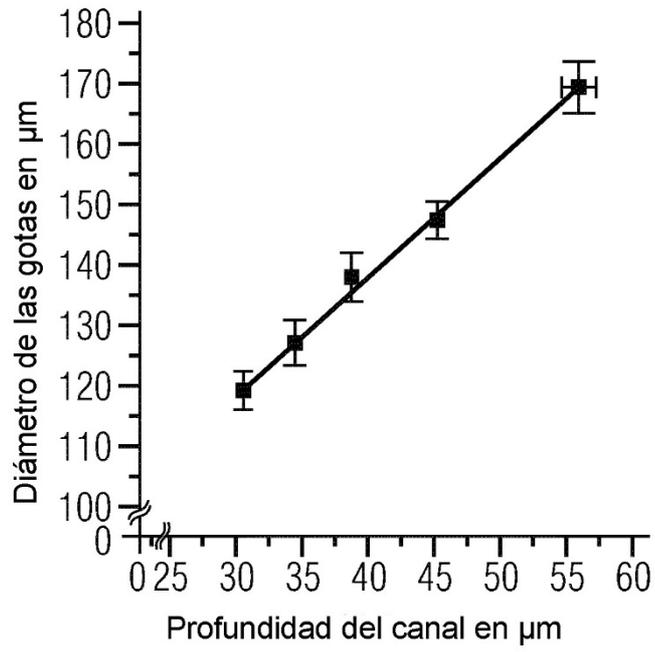


FIG 5A

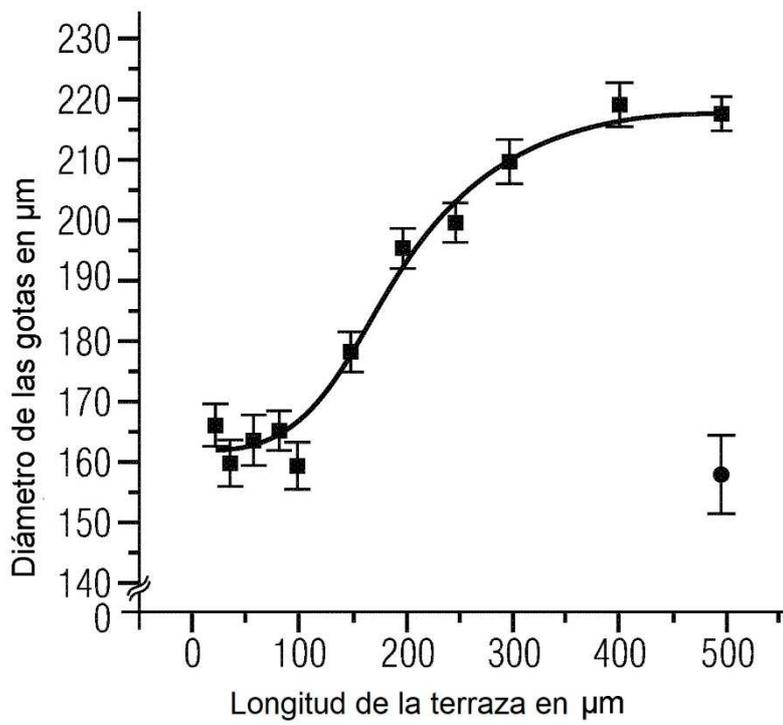


FIG 5B

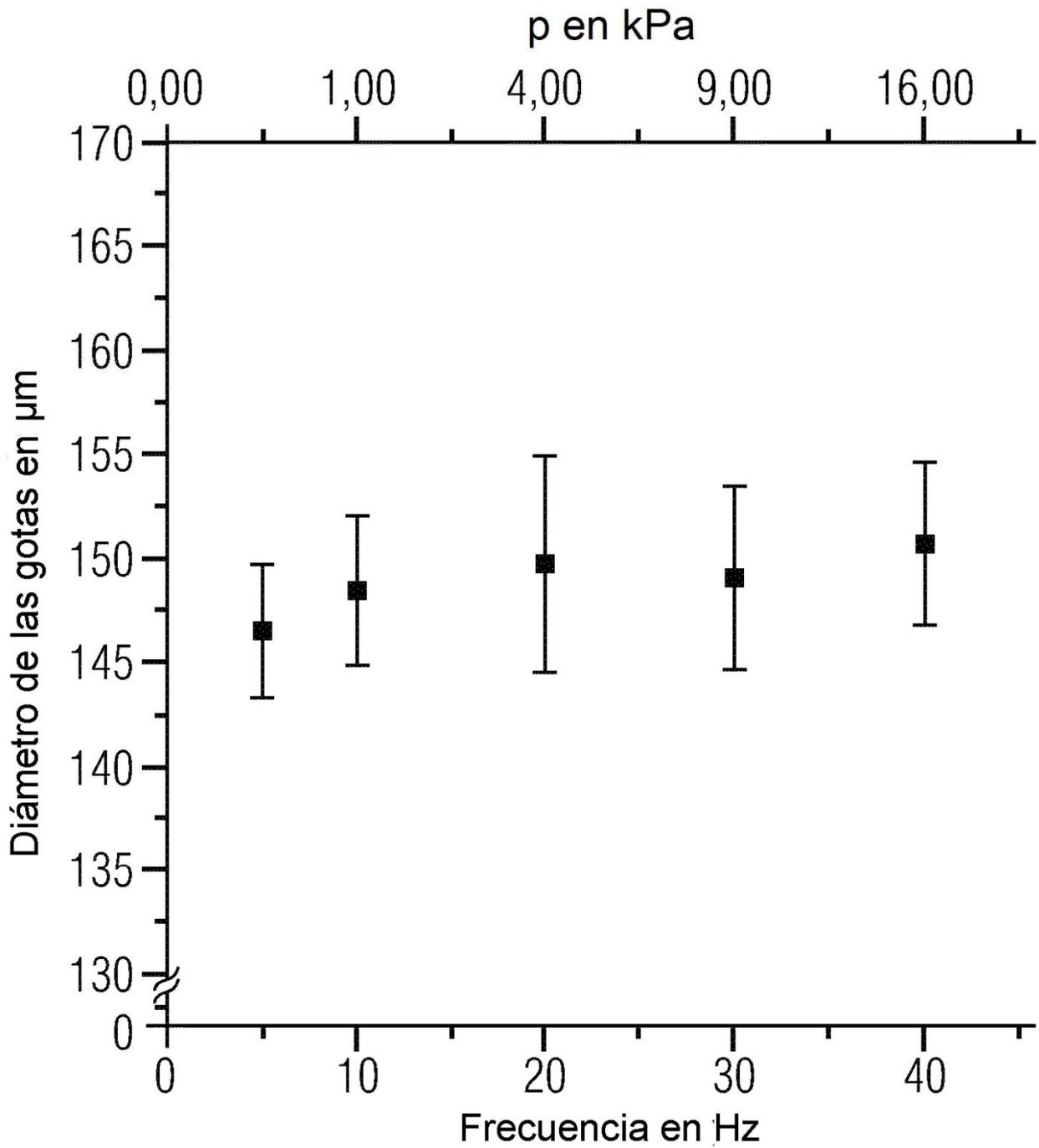


FIG 5C

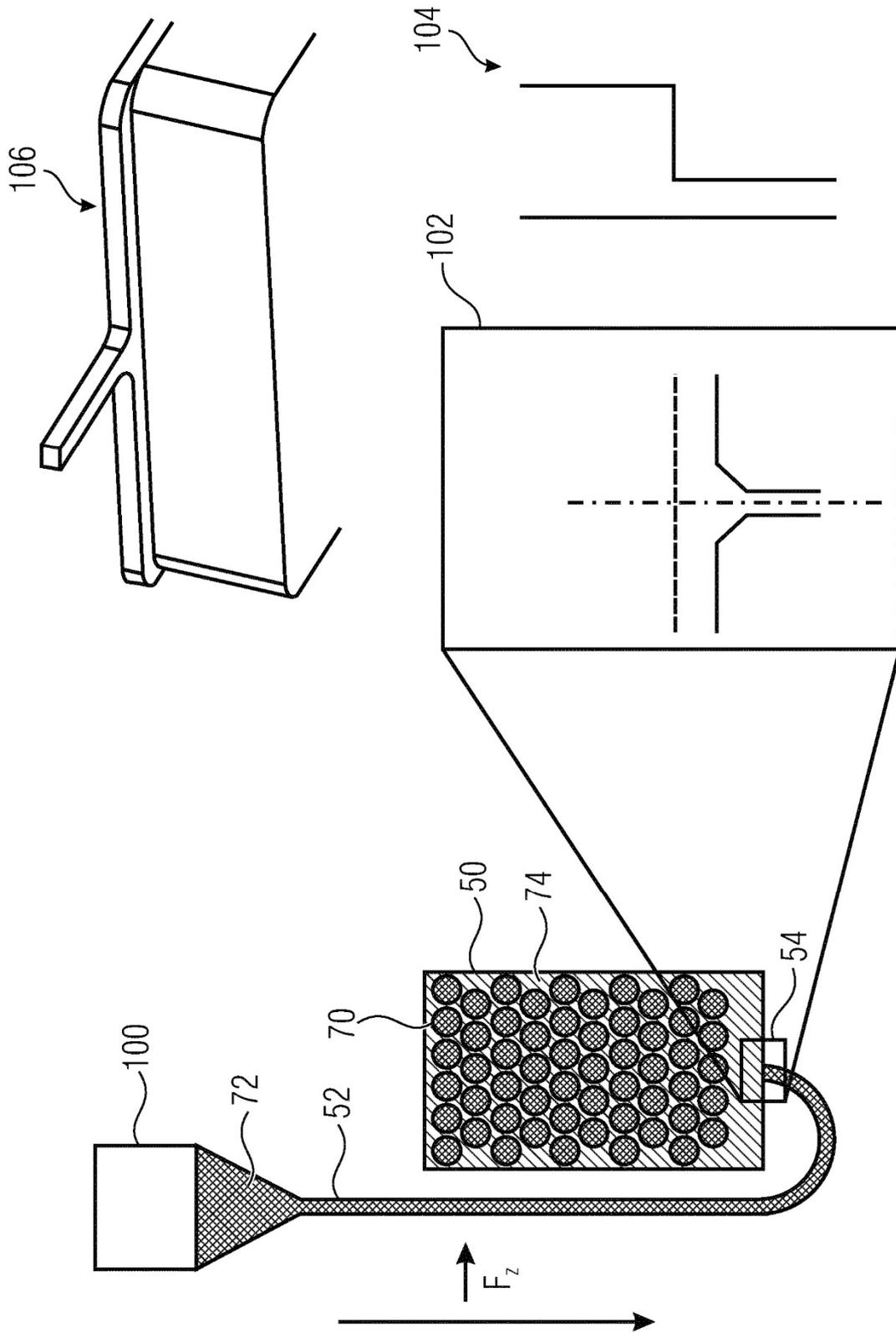


FIG 6

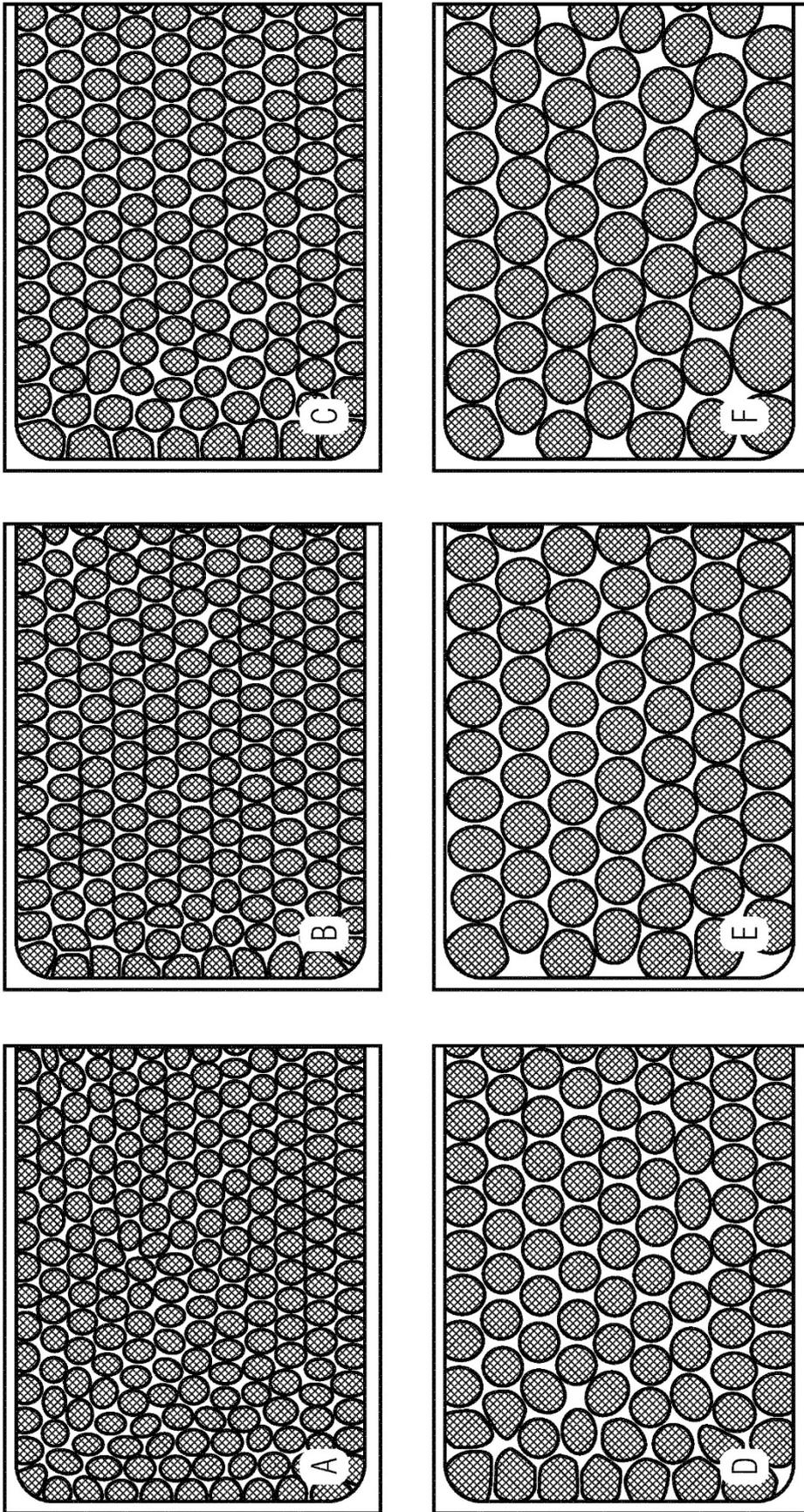


FIG 7

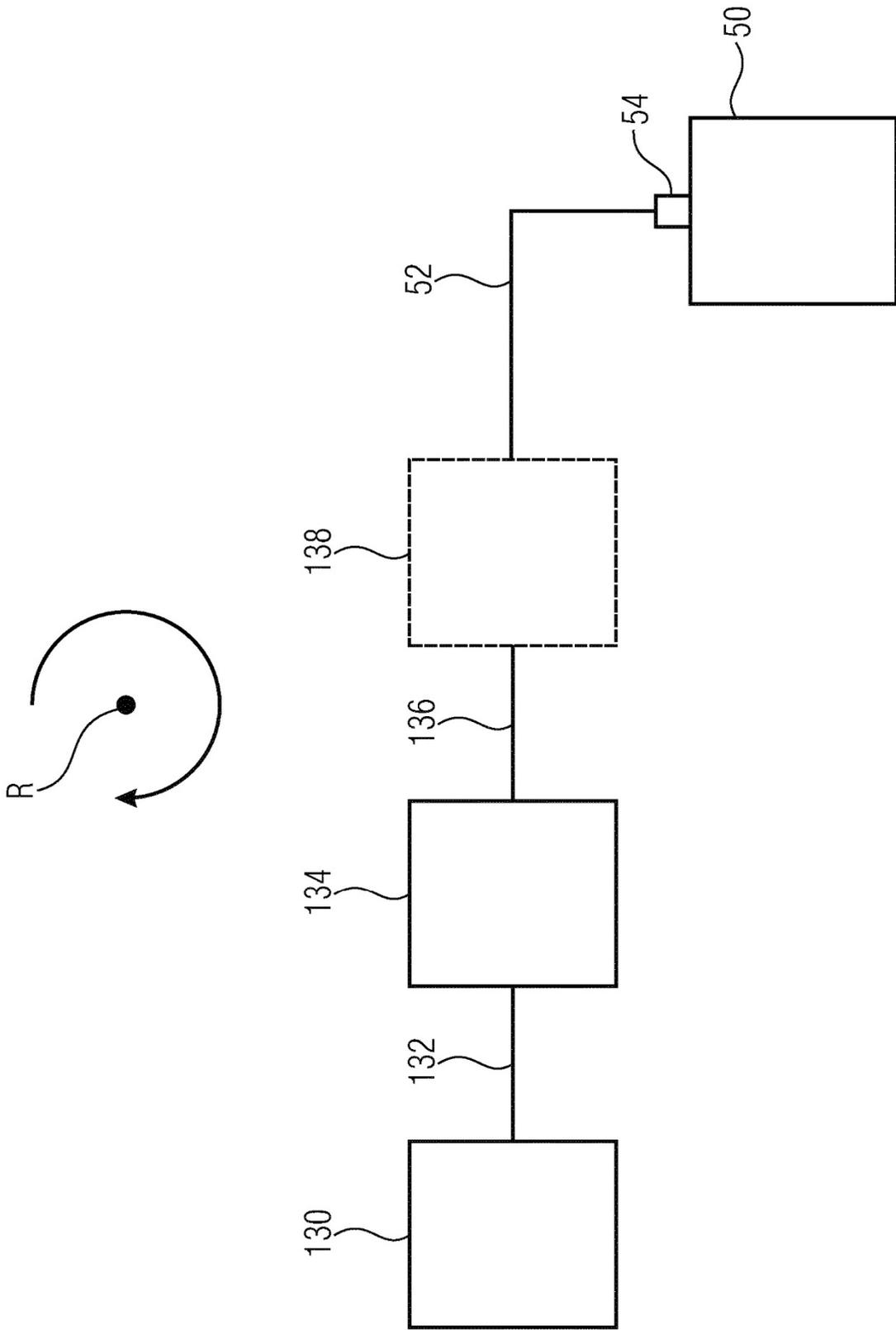


FIG 8

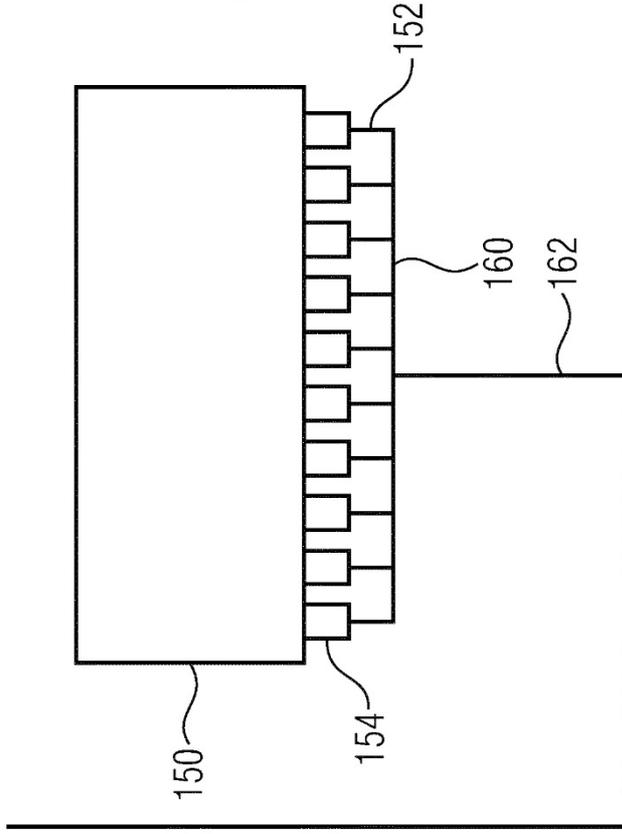
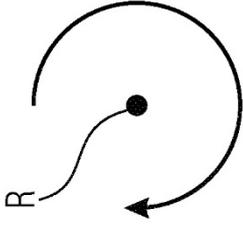


FIG 9B

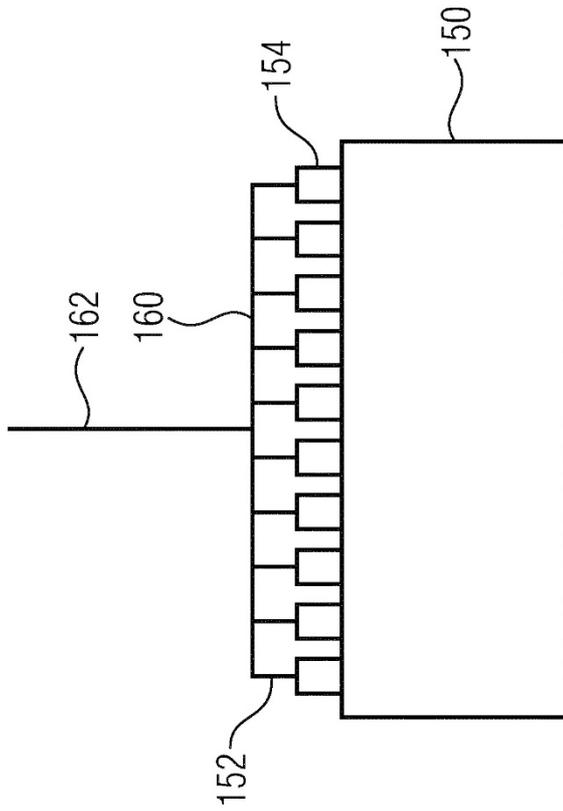
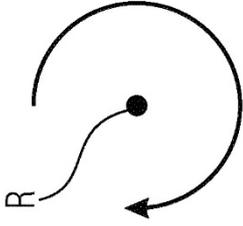


FIG 9A

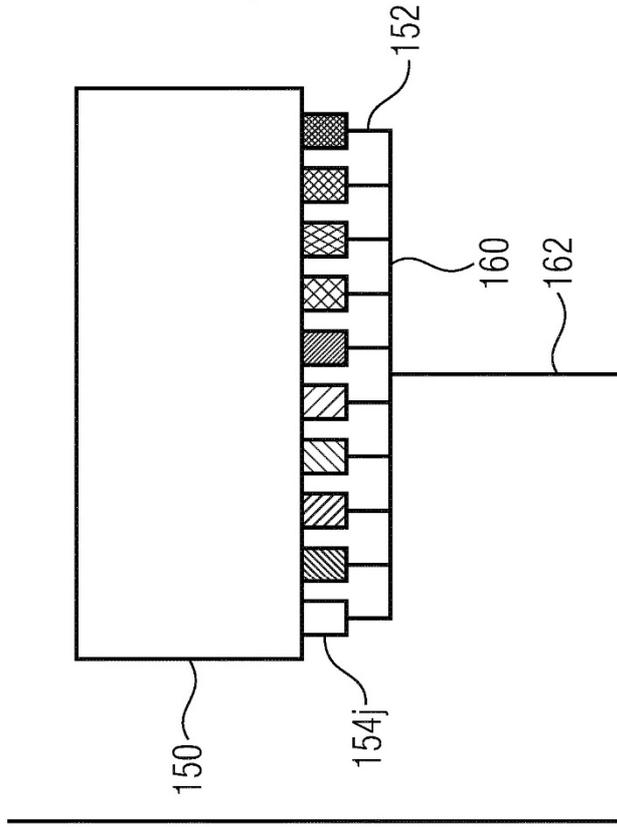
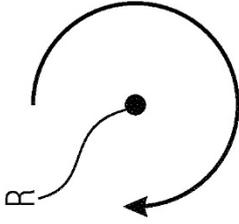


FIG 10B

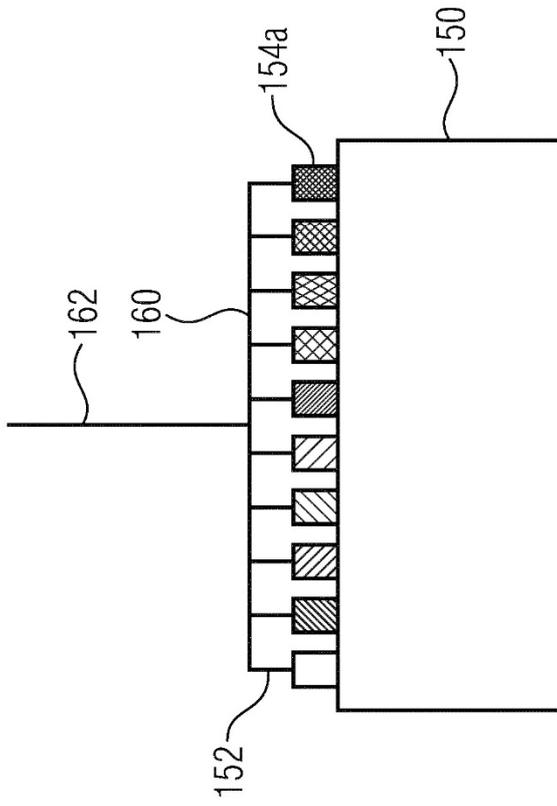
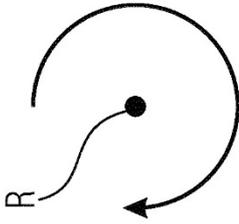


FIG 10A

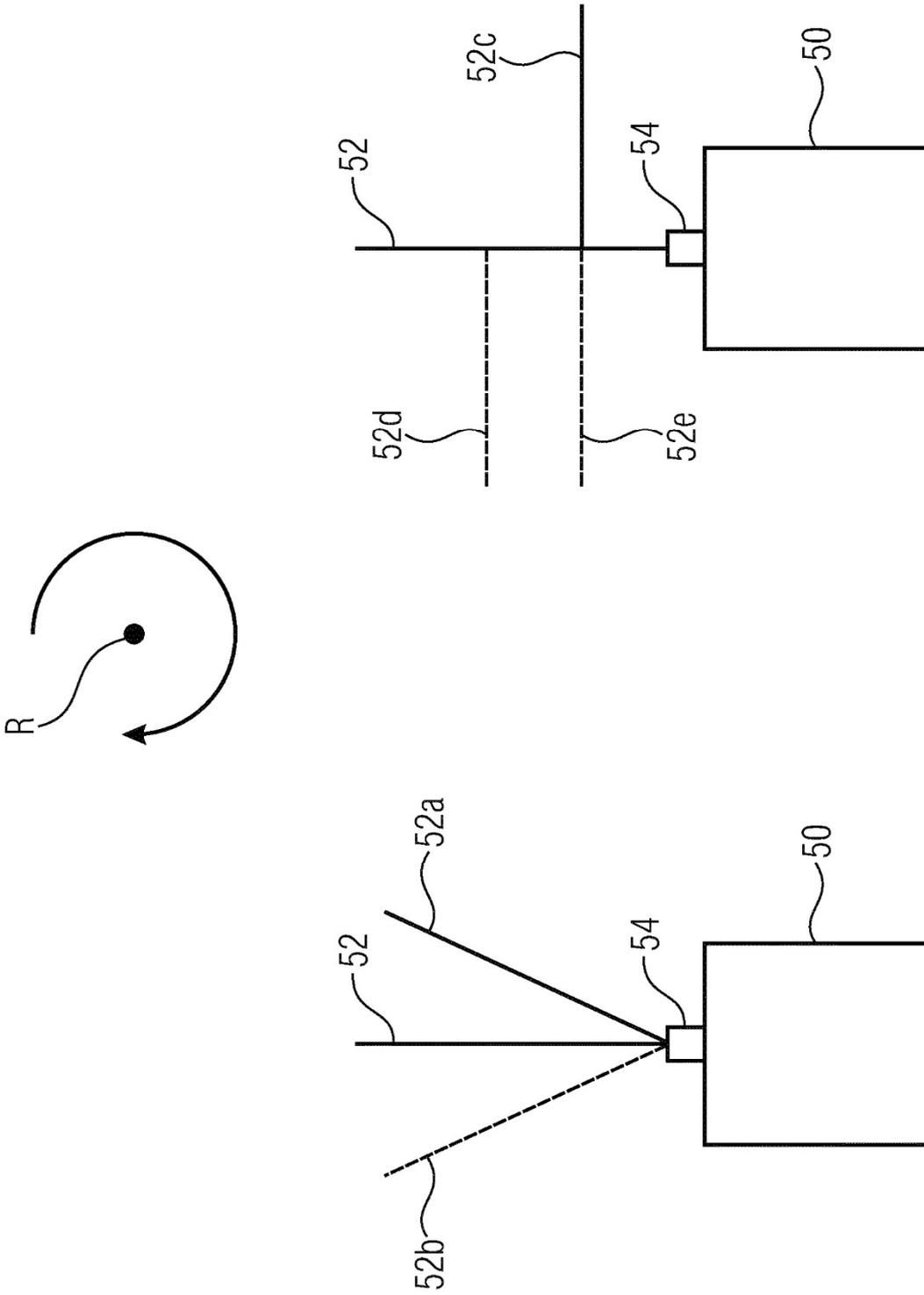


FIG 11

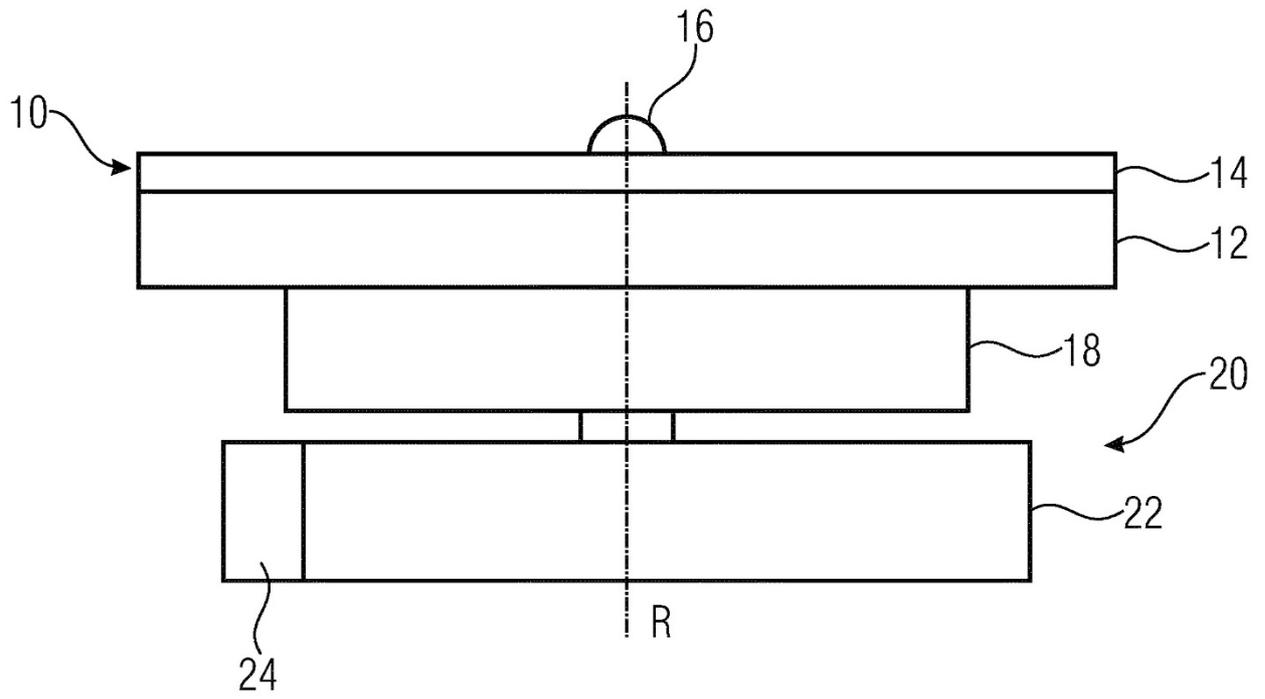


FIG 12

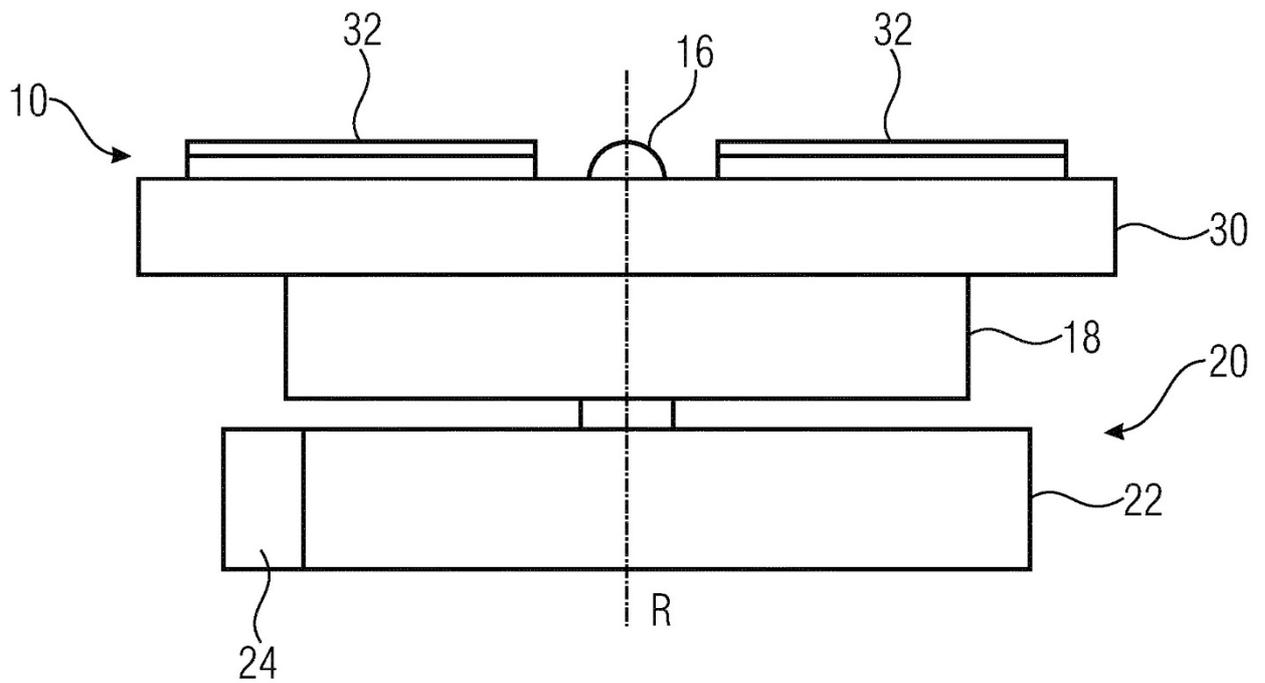


FIG 13