

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 832 486**

(51) Int. Cl.:

**G01N 35/08** (2006.01)  
**G01N 15/14** (2006.01)  
**G01N 1/28** (2006.01)  
**G01N 29/24** (2006.01)  
**G01N 15/10** (2006.01)  
**G05D 11/13** (2006.01)  
**B01J 13/04** (2006.01)  
**G01N 21/64** (2006.01)  
**B01L 3/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013 E 18178872 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020 EP 3410124**

---

(54) Título: **Generación de gotitas a demanda a alta velocidad y encapsulación de células individuales dirigida por una cavitación inducida**

(30) Prioridad:

**09.02.2012 US 201213370196**

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

**10.06.2021**

(73) Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
1111 Franklin Street, 12th Floor  
Oakland, CA 94607, US**

(72) Inventor/es:

**CHIOU, PEI-YU;  
WU, TING-HSIANG S.;  
PARK, SUNG-YONG y  
TEITELL, MICHAEL A.**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 832 486 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**

Generación de gotitas a demanda a alta velocidad y encapsulación de células individuales dirigida por una cavitación inducida

#### **Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de, y la prioridad sobre, el documento USSN 13/370.196, depositado el 9 de febrero de 2012.

## Campo

La presente invención se refiere al campo de los microfluidos. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos y dispositivos para la formación de gotitas a alta velocidad y/o la encapsulación de gotitas, de partículas y/o de células.

La técnica anterior se describe en Sung-Yong Park ET AL: "A PULSE LASER-DRIVEN MICROFLUIDIC DEVICE FOR ULTRA-FAST DROPLET GENERATION ON DEMAND AND SINGLE-CELLS ENCAPSULATION", 14<sup>a</sup> CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE SISTEMAS MINIATURIZADOS PARA QUÍMICA Y CIENCIAS DE LA VIDA 2010, GRONINGEN, PAÍSES BAJOS, 1 de enero de 2010 (01-01-2010), páginas 2129-2131, XP055160919, y

VIAJEZ, C.; CRONINGER, FRANCIS B. S.; YOUNG, SUNG-YONG; PARK, SUNG-YONG ET AL: "High-speed droplet generation on demand driven by pulse laser-induced cavitation", Lab on a Chip, vol. 11, n.º 6, 1 de enero de 2011 (01-01-2011), página 1010, XP055000498, ISSN: 14730197, DOI: 10.1039/c0lc00555j

## **Antecedentes**

Los dispositivos de microfluidos han atraído un gran interés, ya que pueden proporcionar una plataforma para llevar a cabo análisis con volúmenes de fluido extremadamente pequeños, y cuando se producen utilizando técnicas de fotolitografía, pueden ser fabricados de una forma económica. Estos dispositivos tienen el potencial de actuar como un "laboratorio en un chip", integrando múltiples funcionalidades que incluyen, por ejemplo, la preparación de la muestra, el termociclado para apoyar la reacción en cadena de la polimerasa y la monitorización de la absorbancia o de la fluorescencia. Su tamaño compacto los hace particularmente adecuados para su uso en dispositivos portátiles, permitiendo potencialmente la realización de sofisticados análisis en una consulta médica o en el terreno. Uno de los desafíos del uso de dispositivos de microfluidos en el análisis de múltiples muestras es, sin embargo, la compartimentalización de la muestra. Mientras que un analizador de laboratorio convencional puede utilizar una serie de cubetas o receptáculos similares para impedir la contaminación entre las muestras, esta metodología es difícil de implementar con pequeños volúmenes de fluido, en los que las interacciones con las superficies del dispositivo pueden dejar sin efecto las propiedades de fluidez de la masa.

Algunos dispositivos de microfluidos típicos utilizan una única fase fluida que fluye de forma continua a través del dispositivo. La introducción de un volumen discreto de una muestra de prueba de fluido o de reactivo en dicho dispositivo da lugar a la formación de un segmento fluido que se mueve a través de los canales del aparato. Desafortunadamente, dicho segmento fluido tenderá a quedar dispersado debido a fuerzas tales como la difusión y la turbulencia en el interior del canal de flujo. Además, es posible que los componentes del segmento fluido interactúen con las paredes de los canales del dispositivo de microfluído, únicamente para ser liberados en un momento posterior. Dicho fenómeno puede dar como resultado una contaminación entre segmentos fluidos y da lugar a la necesidad de diseñar dichos chips microfluidos con unas características que reduzcan las turbulencias en el interior de canales de fluido, y de diseñar protocolos de ensayo que incorporen un largo lavado o aclarado del volumen interior entre muestras. Además, la dispersión de los segmentos fluidos hace difícil proporcionar unos volúmenes y unas concentraciones reproducibles del contenido del segmento fluido para las reacciones de caracterización.

Una metodología para resolver este problema ha sido la introducción de dispositivos de microfluidos digitales, en los que los fluidos de muestra para su análisis u otro tratamiento son introducidos en los canales del dispositivo en forma de gotitas discretas de poco volumen. Por ejemplo, la introducción de muestras acuosas con un contenido bioquímico o biológico en forma de gotitas acuosas que viajan en el interior de un canal que contiene un medio oleoso inmiscible reduce la interacción con la pared del canal e impide la dispersión, minimizando la contaminación entre gotitas. Los reactivos usados en la caracterización de dichas muestras pueden ser tratados de forma similar. Con objeto de ser eficaz, sin embargo, un dispositivo de microfluído digital requiere un mecanismo de generación de gotitas a alta velocidad con un control preciso del volumen, con objeto de realizar un análisis completo y preciso de alto rendimiento.

Pueden usarse mecanismos pasivos para la rápida generación continua de gotitas en función del flujo a través de dicho dispositivo. De esta forma pueden generarse gotitas muy uniformes a una velocidad de miles de gotas por segundo (Yobas et al. (2006) Lab on a Chip, 6: 1073-1079). El documento US 7.759.111 describe dicho dispositivo, en el que las gotitas son cortadas desde una corriente de un medio acuoso mediante un flujo de un aceite inmiscible. Otro ejemplo de un dispositivo pasivo se divulga en el documento WO 2010/110843A1, en el que una barrera

introducida en un canal de fluido actúa junto con el fluido y las características de flujo del canal para formar vórtices que proporcionan variaciones periódicas en la presión que dirige la formación de la gotita. Sin embargo, dichos dispositivos no proporcionan una generación a demanda de una gotita que contiene específicamente el volumen indicado de fluido de muestra (por ejemplo, un volumen que contiene una célula de interés en particular) y no se prestan a la producción de gotitas individuales con diferentes volúmenes. Esto limita su utilidad para la caracterización de diferentes volúmenes demuestra y en la realización de una diversidad de protocolos de ensayo.

Los métodos activos para la generación de gotitas, que se basan en el uso de una fuerza aplicada para dirigir la formación de la gotita, pueden abordar estos problemas. Dichos dispositivos pueden incorporar unos componentes físicos que regulan el flujo a través del dispositivo. Un ejemplo de esto es el uso de microválvulas dirigidas neumáticamente que están integradas en el dispositivo de microfluído (Zeng et al. (2009) Lab on a Chip 9: 134-1343), que permitían la formación controlada de gotitas a unas velocidades tan altas como de 100 gotitas por segundo. Otro ejemplo de esta metodología es el uso de una pared móvil de un material flexible (PDMS) que está integrada en el chip microfluído y dirigida por una presión de aire para interrumpir periódicamente el flujo de una fase de fluido con objeto de proporcionar una dispersión (Hsiung et al. (2006) J. Micromechanics and Microengineering, 16: 2403-2410), que mostraba unas velocidades de formación de gotitas tan altas como de 20 por segundo. Otro ejemplo más, el documento US 2010/0059120, desvela el uso de dos canales conectados por una abertura, en los que un interruptor del flujo en un canal puede ser activado para bloquear el flujo de fluido y forzar una porción de su contenido hacia el segundo canal. Otro ejemplo de dicho dispositivo se describe en el documento US 2010/0163412, que desvela un dispositivo que incorpora un depósito de fluido flexible que es comprimido brevemente por un dispositivo piezoelectrónico incorporado para generar presión para la formación de las gotitas. Dichas características añaden significativamente complejidad al diseño de estos dispositivos de microfluidos, complicando adicionalmente el proceso de fabricación. La naturaleza mecánica de dichas metodologías limita la frecuencia con la que pueden ser producidas las gotitas, y pueden mostrar cambios en su rendimiento con el tiempo. Además, estas metodologías tienden a producir unas poblaciones de gotitas con una mayor variación en el tamaño de las gotitas que las producidas mediante el uso de dispositivos pasivos.

Otras metodologías para la generación activa de gotitas se han basado en el uso de energías sin masa o esencialmente sin masa aplicadas en el dispositivo, con objeto de evitar los inconvenientes de los componentes mecánicos. Algunas de estas utilizan la aplicación de campos eléctricos al dispositivo para alterar el flujo del fluido o cambiar las propiedades de la interfase entre los dos fluidos, con objeto de facilitar la formación de las gotitas. Esto puede requerir unas grandes diferencias en la conductividad entre los fluidos implicados, lo que limita la utilidad de dichos dispositivos. Por ejemplo, el documento US 2006/0231398 desvela el uso de diferencias de potencial para mover gotitas entre fluidos inmiscibles de baja y alta resistencia mediante electrohumedecimiento, utilizando una diferencia de potencial para reducir temporalmente la tensión superficial en la interfase entre los fluidos hasta que el patrón de flujo existente sea suficiente para generar las gotitas. Una metodología similar se describe en el documento WO 2010/151776, en el que una diferencia de potencial dirige una combinación de efectos, que incluyen un flujo electrocinético y la interferencia en la interfase entre dos fluidos inmiscibles, para generar las gotitas. Otro ejemplo más del uso de diferencias de potencial para dirigir la formación de gotitas se encuentra en el documento WO 2011/023405A1, que desvela una combinación de una estructura de boquilla y el establecimiento de una diferencia de potencial para la electronebulización de gotitas de un fluido conductor en un fluido dieléctrico. Una metodología que no requiere unas grandes diferencias en la conductividad entre los fluidos implicados en la formación de las gotitas se divulga en el documento US 2005/0031657, que describe el calentamiento de una porción de un recipiente en el interior del dispositivo usando un calentador de resistencia hasta que una porción del fluido almacenado en el mismo se evapora. La presión del fluido evaporado empuja una porción del resto del fluido a través de una boquilla hacia un fluido inmiscible. Sin embargo, la generación de gotitas a partir de esta metodología es relativamente lenta, produciendo únicamente alrededor de 15-25 gotitas por segundo y por boquilla. Aunque estas metodologías evitan el uso de componentes mecánicos, requieren la incorporación de electrodos, calentadores de resistencia o componentes similares en el dispositivo. Esto añade complejidad al diseño del dispositivo y requiere además el uso de características de respaldo para un suministro fiable de corriente.

## Sumario

En varias realizaciones se describen en el presente documento nuevos métodos y dispositivos para generar rápida y reproduciblemente gotitas de un primer fluido en un segundo fluido. Los fluidos pueden ser inmiscibles, en los que los fluidos inmiscibles pueden incluir fluidos que no son significativamente solubles entre sí, fluidos que no se mezclan durante un periodo de tiempo debido a propiedades físicas tales como la densidad o la viscosidad, y fluidos que no se mezclan durante periodos de tiempo debido al flujo laminar. La formación de gotitas está dirigida por la expansión y la posterior contracción de unas burbujas temporales (tales como burbujas de cavitación) en el interior del primer fluido. Alternativamente, la formación de burbujas en el interior de un primer fluido puede provocar que actúen sobre un segundo fluido, dirigiendo así la generación de gotitas del segundo fluido en un tercer fluido. Las burbujas de cavitación pueden ser generadas usando una fuente de energía dirigida, eliminando así la necesidad de incorporar electrodos, calentadores o componentes similares en los dispositivos que incorporan la invención. Algunas fuentes de energía dirigida adecuadas incluyen, pero no se limitan a, un láser de pulsos, cuyo uso permite la formación a demanda de gotitas muy reproducibles a unas velocidades de desde menos de 1 hasta 100.000 gotitas por segundo. El volumen de la gotita puede ser controlado, con unos volúmenes de gotita, en ciertas

realizaciones, que varían desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 150 picolitros. En ciertas realizaciones, pueden capturarse células vivas en el interior de dichas gotitas, con una elevada viabilidad celular, en ciertas realizaciones de hasta el 92,07 %. Dado que no son necesarias válvulas ni bombas, estos métodos y dispositivos son particularmente adecuados para su uso en dispositivos de microfluidos.

- 5 En una realización se acoplan operativamente un primer fluido y un segundo fluido, que pueden ser inmiscibles. En ciertas realizaciones, el acoplamiento operativo puede tomar la forma de una comunicación fluida. En otras realizaciones puede interponerse una membrana flexible entre el primer fluido y el segundo fluido. La generación de una burbuja de cavitación en el interior del primer fluido genera una suficiente velocidad y/o impulso y/o desplazamiento hacia el primer fluido para mover un volumen controlado del segundo fluido. En ciertas realizaciones, dicha burbuja de cavitación se expande y se contrae en 1 milisegundo, puede mover un volumen controlado de aproximadamente 1 microlitro o menos. Dichas burbujas de cavitación pueden ser producidas mediante irradiación, por ejemplo, con un láser de pulsos. En algunas realizaciones, el volumen del volumen controlado del segundo fluido puede ser controlado mediante la energía y/o la frecuencia de pulsos y/o la longitud de onda del láser de pulsos, que a su vez puede estar modulado por un controlador.
- 10 En otra realización, una primera trayectoria de fluido y una segunda trayectoria de fluido se acoplan a través de una abertura. En algunas realizaciones, los fluidos de la primera y de la segunda trayectoria de fluido son inmiscibles. La generación de una burbuja de cavitación en el interior de la primera trayectoria de fluido imparte una suficiente velocidad a una porción del primer fluido para causar que una gotita del primer fluido se mueva a través de la abertura y hacia la segunda trayectoria de fluido. En ciertas realizaciones, la abertura puede estar configurada como un puerto, un canal o una boquilla. Dichas burbujas de cavitación pueden ser producidas mediante irradiación, por ejemplo, con un láser de pulsos. En algunas realizaciones, la intensidad, la duración y/o la posición de la irradiación del láser puede ser modulada el volumen de la gotita.
- 15 En otra realización de la invención, una primera trayectoria de fluido y una segunda trayectoria de fluido están en comunicación fluida, y la segunda trayectoria de fluido se acopla a una tercera trayectoria de fluido a través de una abertura. En algunas realizaciones, los fluidos de la segunda y la tercera trayectoria de fluido son inmiscibles. La generación de una burbuja de cavitación en el interior de la primera trayectoria de fluido imparte la suficiente velocidad a una porción del segundo fluido para causar que una gotita del segundo fluido se mueva a través de la abertura y hacia la tercera trayectoria de fluido. En ciertas realizaciones, la abertura puede estar configurada como un puerto, un canal o una boquilla. En algunas realizaciones, el segundo fluido puede incluir partículas y/o células. La segunda trayectoria de fluido puede estar monitorizada, siendo los datos producidos por dicha monitorización transmitidos a un controlador. En algunas realizaciones, las burbujas de cavitación son producidas mediante irradiación, que puede ser iniciada por un controlador. La irradiación puede estar en forma de un pulso de láser, y en algunas realizaciones, el volumen de la gotita puede ser modulado usando la intensidad, la duración y la posición del pulso de láser.
- 20 En otra realización, hay interpuesta una membrana flexible entre una primera trayectoria de fluido y una segunda trayectoria de fluido, y la segunda trayectoria de fluido se acopla a una tercera trayectoria de fluido a través de una abertura. En algunas realizaciones, los fluidos de la segunda y de la tercera trayectoria de fluido son inmiscibles. La generación de una burbuja de cavitación en el interior de la primera trayectoria de fluido da como resultado la deformación elástica de una porción de la membrana flexible en la segunda trayectoria de fluido. Esta deformación elástica imparte la suficiente velocidad a una porción del segundo fluido para causar que una gotita del segundo fluido se mueva a través de la abertura y hacia la tercera trayectoria de fluido. La abertura puede estar configurada como un controlador. En algunas realizaciones, el segundo fluido puede incluir partículas y/o células. La segunda trayectoria de fluido puede estar monitorizada, siendo los datos producidos por dicha monitorización transmitidos a un controlador. En algunas realizaciones, las burbujas de cavitación son producidas mediante irradiación, que puede ser iniciada por un controlador. La irradiación puede estar en forma de un pulso de láser, y en algunas realizaciones el volumen de la gotita puede ser modulado usando la intensidad, la duración y la posición del pulso de láser.
- 25 En otra realización de la invención, una primera trayectoria de fluido y una segunda trayectoria de fluido están conectadas por una abertura, en la que la abertura está posicionada de forma que la formación de una burbuja en la primera trayectoria de fluido puede inducir una fuerza que cause que una gotita del primer fluido se mueva a través de la abertura y hacia la segunda trayectoria de fluido. En ciertas realizaciones, la abertura puede estar configurada como un puerto, un canal o una boquilla. En algunas realizaciones, la abertura está configurada como una boquilla. Se acopla un controlador a una fuente de energía (tal como, por ejemplo, un láser de pulsos) que puede dirigir la energía de la primera trayectoria de fluido para causar la formación de una o más burbujas. En algunas realizaciones, la burbuja puede ser una burbuja de cavitación. En otras realizaciones más, la fuente de energía es un láser de pulsos; el controlador puede estar configurado para ajustar el volumen de la gotita modulando la intensidad, la duración y/o la posición de un pulso de láser producido por un láser de pulsos.
- 30 En otra realización más, una primera trayectoria de fluido y segunda trayectoria de fluido están posicionadas de forma que hay interpuesta una membrana flexible entre ellas. La membrana flexible está a su vez posicionada de forma que la formación de una burbuja en el interior de la primera trayectoria de fluido da como resultado la deformación elástica de una porción de la membrana flexible, que a su vez induce una fuerza sobre el fluido
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

contenido en la segunda trayectoria de fluido. La segunda trayectoria de fluido y una tercera trayectoria de fluido están conectadas por una abertura, que está dispuesta de tal forma que cuando se ejerce una fuerza sobre el fluido de la segunda trayectoria de fluido, una gotita del fluido es extruida a través de la abertura en la tercera trayectoria de fluido. Hay un controlador configurado para dirigir la energía que da como resultado la formación temporal de una burbuja en la primera trayectoria de fluido. Esta burbuja temporal puede ser una burbuja de cavitación. En ciertas realizaciones, la abertura puede estar configurada como un puerto, un canal o una boquilla. En algunas realizaciones, la abertura está configurada como una boquilla. En varias realizaciones, puede haber un monitor configurado para monitorizar la segunda trayectoria de fluido o la tercera trayectoria de fluido, en el que el monitor transmite los datos recogidos al controlador. En ciertas realizaciones, el controlador puede estar configurado para controlar la transferencia de un volumen indicado del fluido de la segunda trayectoria de fluido a la tercera trayectoria de fluido, en el que el volumen indicado se determina mediante el uso de los datos del monitor.

En algunas realizaciones, una trayectoria de fluido puede incluir partículas o células que están encapsuladas por las gotitas del fluido circundante que son extruidas en otra trayectoria de fluido. Puede incluirse un monitor en algunas realizaciones para caracterizar dichas partículas o células que, cuando está acoplado a un controlador, puede permitir la encapsulación controlada de partículas o de células específicas en el interior de una gotita específica.

En varias realizaciones se proporcionan dispositivos para la generación de las gotitas. En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende una primera corriente de fluido (por ejemplo, una corriente de un microfluido) que comprende un primer fluido adyacente a una segunda corriente de fluido (por ejemplo, una corriente de un microfluido) que comprende un segundo fluido, en el que el segundo fluido es inmiscible en el primer fluido. En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende un primer microcanal de fluido que comprende, que contiene y/o que dirige la primera corriente de fluido; y un segundo microcanal de fluido que comprende, que contiene y/o que dirige la segunda corriente de fluido, en los que el primer microcanal de fluido es adyacente a, o está en las proximidades de, el primer microcanal de fluido y está en comunicación fluida con el segundo canal (por ejemplo, a través de un puerto o de un canal). En ciertas realizaciones, el segundo fluido comprende un fluido acuoso. En ciertas realizaciones, el primer fluido comprende un aceite o un disolvente orgánico. En ciertas realizaciones, el primer fluido comprende un disolvente seleccionado entre el grupo que consiste en tetracloruro de carbono, cloroformo, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, diclorometano, éter dietílico, dimetilformamida, acetato de etilo, heptano, hexano, metil-terc-butil éter, pentano, tolueno, y 2,2,4-trimetilpentano. En ciertas realizaciones, el primer fluido comprende un aceite. En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende una tercera corriente de fluido dispuesta entre la primera corriente de un microfluido y la segunda corriente de un microfluido. En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende una tercera corriente de un fluido dispuesta entre el segundo fluido y el puerto o el canal. En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende además una tercera corriente del fluido dispuesta en el segundo microcanal de fluido entre el puerto y el segundo fluido. En ciertas realizaciones, la tercera corriente de fluido contiene gotitas, células o partículas que van a ser encapsuladas. En ciertas realizaciones, el puerto o el canal comprende una boquilla. En ciertas realizaciones, el primer y/o el segundo microcanal de fluido está formado a partir de un material seleccionado entre el grupo que consiste en vidrio, metal, cerámica, mineral, plástico y polímero. En ciertas realizaciones, el primer y/o el segundo microcanal de fluido está formado a partir de un material elastomérico (por ejemplo, polidimetilsiloxano (PDMS), plastómeros de poliolefina (POP), perfluoropolietileno (a-PFPE), poliuretano, poliimidadas y la resina NOVOLAC® reticulada (polímero de formaldehído fenólico), y similares).

En ciertas realizaciones, el dispositivo produce un volumen sustancialmente continuo ajustado de gotitas que varía desde aproximadamente 0,1 fl o desde aproximadamente 1 fl, o desde aproximadamente 10 fl o desde aproximadamente 50 fl, o desde aproximadamente 100 fl, o desde aproximadamente 500 fl hasta aproximadamente 1 µl, o hasta aproximadamente 500 nl, o hasta aproximadamente 1 nl, o hasta aproximadamente 500 pl, o hasta aproximadamente 400 pl o hasta aproximadamente 300 pl o hasta aproximadamente 200 pl o hasta aproximadamente 150 pl. En ciertas realizaciones, el dispositivo produce un volumen sustancialmente continuo ajustado de gotitas que varía desde aproximadamente 0,1 fl hasta aproximadamente 1 µl, o desde aproximadamente 0,1 fl hasta aproximadamente 500 nl, o desde aproximadamente 1 fl hasta aproximadamente 1 nl, o desde aproximadamente 1 fl hasta aproximadamente 500 pl, o desde aproximadamente 500 fl hasta aproximadamente 500 pl o desde aproximadamente 1 pl hasta aproximadamente 150 pl. En ciertas realizaciones, el dispositivo puede proporcionar una generación a demanda de gotitas a una velocidad mayor de aproximadamente 1.000, más preferentemente mayor de aproximadamente 2.000 gotitas/s, más preferentemente mayor de aproximadamente 4.000 gotitas/s, más preferentemente mayor de aproximadamente 6.000 gotitas/s, o más preferentemente mayor de aproximadamente 8.000 gotitas/s. En ciertas realizaciones, el dispositivo puede proporcionar una generación a demanda de gotitas a una velocidad que varía desde cero gotitas/s, 1 gotitas/s, 2 gotitas/s, aproximadamente 5 gotitas/s, aproximadamente 10 gotitas/s, aproximadamente 20 gotitas/s, aproximadamente 50 gotitas/s, aproximadamente 100 gotitas/s, aproximadamente 500 gotitas/s, o aproximadamente 1.000 gotitas/s, hasta aproximadamente 1.500 gotitas/s, aproximadamente 2.000 gotitas/s, aproximadamente 4.000 gotitas/s, aproximadamente 6.000 gotitas/s, aproximadamente 8.000 gotitas/s, aproximadamente 10.000 gotitas/s, aproximadamente 20.000 gotitas/s, aproximadamente 50.000 gotitas/s o aproximadamente 100.000 gotitas/s. En ciertas realizaciones, el dispositivo puede proporcionar una generación a demanda de gotitas a una velocidad mayor de aproximadamente 1.000, más preferentemente mayor de aproximadamente 10.000, más preferentemente mayor de aproximadamente 20.000 gotitas/s, más preferentemente mayor de aproximadamente 40.000, más preferentemente mayor de aproximadamente 50.000 gotitas/s, más preferentemente mayor de aproximadamente

80.000, o más preferentemente mayor de aproximadamente 100.000 gotitas/s. En ciertas realizaciones, el dispositivo está presente en (o es un componente de) un sistema que comprende una fuente de energía capaz de formar una burbuja en una corriente de fluido o en un microcanal. En ciertas realizaciones, la fuente de energía comprende una fuente de energía óptica o un emisor de microondas. En ciertas realizaciones, la fuente de energía comprende un láser (por ejemplo, un láser de pulsos). En ciertas realizaciones, el dispositivo y/o el sistema están configurados para excitar las burbujas de vapor de la segunda corriente de microfluido. En ciertas realizaciones, el dispositivo y/o el sistema están configurados para excitar las burbujas de vapor del segundo microcanal de fluido en las proximidades del puerto o del canal. En ciertas realizaciones, el dispositivo y/o el sistema están configurados para excitar las burbujas de vapor del tercer microcanal de fluido o de la cámara que no está en comunicación fluida con la primera o la segunda corriente de microfluido. En ciertas realizaciones, donde las burbujas de vapor son excitadas en un medio líquido o de gel. En ciertas realizaciones, las burbujas de vapor son excitadas en un aceite o un medio no acuoso. En ciertas realizaciones, las burbujas de vapor son excitadas en un medio que comprende nano/micropartículas absorbentes de luz (por ejemplo, moléculas de un colorante, nanopartículas metálicas, y similares). En ciertas realizaciones, el dispositivo está dispuesto sobre un sustrato que comprende un material seleccionado entre el grupo que consiste en un polímero, un plástico, un vidrio, cuarzo, un material dieléctrico, un semiconductor, silicio, germanio, cerámica y un metal o una aleación metálica. En ciertas realizaciones, el dispositivo está integrado con otros componentes del microfluido (por ejemplo, componentes del microfluido tales como PDMS canales, pocillos, válvulas, y similares). En ciertas realizaciones, el dispositivo es un componente de un lab-en-un-chip.

En varias realizaciones se proporcionan sistemas para la generación de gotitas y/o la encapsulación de partículas o de células. En ciertas realizaciones, los sistemas un dispositivo como se ha descrito anteriormente (o a continuación), y una fuente de excitación para la formación de burbujas de gas en un fluido. En ciertas realizaciones, la fuente de excitación es un láser, una fuente de microondas o una fuente de energía ultrasónica. En ciertas realizaciones, el sistema comprende adicionalmente componentes para la detección de las partículas o de las células en el sistema (por ejemplo, un sistema de detección óptico, un sistema de detección eléctrico, un sistema de detección magnético, un sistema de detección de ondas acústicas, un sistema de detección electroquímico, y similares). En ciertas realizaciones, los componentes comprenden un sistema de detección óptico para la detección de la dispersión, la fluorescencia o la señal de espectroscopía s ramen.

En varias realizaciones se proporcionan métodos para la generación de gotitas. En ciertas realizaciones, los métodos implican proporcionar un dispositivo como se ha descrito anteriormente (y a continuación en el presente documento); y utilizar una fuente de energía para formar las burbujas en la segunda corriente de microfluido o en el segundo microcanal de fluido o en un tercer microcanal o cámara de fluido, para injectar las gotitas en la primera corriente o canal de microfluido. En ciertas realizaciones, la utilización de una fuente de energía comprende la utilización de un láser de pulsos para excitar las burbujas de cavitación de la segunda corriente o canal de microfluido o del tercer microcanal o cámara de fluido.

En varias realizaciones se proporcionan métodos para mover una cantidad controlada de un fluido. En ciertas realizaciones, dichos métodos comprenden: generar una burbuja de cavitación en un primer fluido, en el que la burbuja de cavitación imparte una suficiente velocidad a una porción del primer fluido para mover así un volumen controlado de un segundo fluido que está acoplado operativamente al primer fluido. En ciertas realizaciones, el volumen controlado del segundo fluido es de aproximadamente 10  $\mu$ l o menos, o de aproximadamente 5  $\mu$ l o menos, o de aproximadamente 1  $\mu$ l o menos, o de aproximadamente 500 nl o menos, o de aproximadamente 100 nl o menos, o de aproximadamente 1 nl o menos, o de aproximadamente 500 pl o menos, o de aproximadamente 200 pl o menos. En ciertas realizaciones, la burbuja de cavitación tiene una duración de aproximadamente 100 ms o menos, o de aproximadamente 50 ms o menos, o de aproximadamente 1 ms o menos, o de aproximadamente 0,5 ms o menos, o de aproximadamente 1 ms o menos o de aproximadamente 0,5 ms o menos, o de aproximadamente 0,1 ms o menos, o de aproximadamente 0,05 ms o menos. En ciertas realizaciones, el volumen controlado del segundo fluido es de 1  $\mu$ l o menos y la duración de la burbuja de cavitación es de aproximadamente 1 ms o menos. En ciertas realizaciones, el primer fluido y el segundo fluido están en comunicación fluida. En ciertas realizaciones, hay interpuesta una membrana flexible entre el primer fluido y el segundo fluido. En ciertas realizaciones, el primer y el segundo fluido son inmiscibles. En ciertas realizaciones, la burbuja de cavitación es generada por irradiación de un volumen del primer fluido con un láser de pulsos. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente el control del volumen controlado del segundo fluido usando un controlador que ajusta al menos una de la energía y/o la frecuencia de los pulsos y/o la longitud de onda del láser de pulsos. En ciertas realizaciones, el método comprende la generación de una pluralidad de burbujas de cavitación individuales y adicionales a una frecuencia de al menos aproximadamente 1.000 Hz, o de al menos aproximadamente 5.000 Hz, o de al menos aproximadamente 10.000 Hz. En ciertas realizaciones, el volumen controlado del segundo fluido es de aproximadamente 500 nanolitros o menos. En ciertas realizaciones, el volumen controlado del segundo fluido es de aproximadamente 200 pl o menos. En ciertas realizaciones, el método se repite a una frecuencia de aproximadamente 1 kHz o mayor, o a una frecuencia de aproximadamente 5 kHz o mayor, o a una frecuencia de aproximadamente 10 kHz o mayor.

En varias realizaciones se proporcionan métodos para la generación de gotitas en un dispositivo. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden: proporcionar una primera trayectoria de fluido que comprende un primer fluido; una segunda trayectoria de fluido que comprende un segundo fluido; y una abertura que acopla de forma

fluida la primera trayectoria de fluido con la segunda trayectoria de fluido; y generar una burbuja de cavitación en la primera trayectoria de fluido, en la que la burbuja de cavitación imparte la suficiente velocidad y/o impulso y/o desplazamiento a una porción del primer fluido de forma que se extruya una gotita del primer fluido a través de la abertura y hacia la segunda trayectoria de fluido. En ciertas realizaciones, el primer fluido y el segundo fluido son fluidos inmiscibles. En ciertas realizaciones, el primer fluido es un fluido acuoso y el segundo fluido es un disolvente orgánico o un aceite. En ciertas realizaciones, el segundo fluido es un fluido acuoso y el primer fluido es un disolvente orgánico o un aceite. En ciertas realizaciones, la abertura está configurada como una boquilla. En ciertas realizaciones, la burbuja de cavitación es generada mediante la irradiación de un volumen del primer fluido con un láser de pulsos. En ciertas realizaciones, el método implica la selección de al menos una de la intensidad, la duración, la longitud de onda y la posición del pulso de láser para producir así un volumen deseado de la gotita.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para la generación de gotitas en un dispositivo que comprende: proporcionar una primera trayectoria de fluido que comprende un primer fluido; una segunda trayectoria de fluido que comprende un segundo fluido, estando la segunda trayectoria de fluido en comunicación fluida con la primera trayectoria de fluido; una tercera trayectoria de fluido que comprende un tercer fluido; y una abertura que acopla de forma fluida la segunda trayectoria de fluido con la tercera trayectoria de fluido; y generar una burbuja de cavitación en la primera trayectoria de fluido, en la que la burbuja de cavitación imparte la suficiente velocidad a una porción del segundo fluido para extruir una gotita del segundo fluido a través de la abertura y hacia la tercera trayectoria de fluido. En ciertas realizaciones, el segundo fluido y el tercer fluido son fluidos inmiscibles. En ciertas realizaciones, el segundo fluido es un fluido acuoso y el tercer fluido es un disolvente orgánico o un aceite. En ciertas realizaciones, el segundo fluido es un fluido acuoso y el tercer fluido es un disolvente orgánico o un aceite. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente monitorizar la segunda trayectoria de fluido y transmitir los datos generados mediante dicha monitorización a un controlador. En ciertas realizaciones, el segundo fluido comprende adicionalmente una partícula. En ciertas realizaciones, el segundo fluido comprende adicionalmente una célula. En ciertas realizaciones, la abertura está configurada como una boquilla. En ciertas realizaciones, la burbuja de cavitación es generada mediante la irradiación de un volumen del primer fluido. En ciertas realizaciones, la irradiación es iniciada por un controlador. En ciertas realizaciones, la irradiación es un pulso de láser. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente la selección de al menos una de la intensidad, la duración, la longitud de onda y la posición del pulso de láser, para producir así un volumen deseado de la gotita.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para la generación de gotitas en un dispositivo que comprende: proporcionar una primera trayectoria de fluido que comprende un primer fluido, una segunda trayectoria de fluido que comprende un segundo fluido, una tercera trayectoria de fluido que comprende un tercer fluido, una membrana flexible interpuesta entre la primera trayectoria de fluido y la segunda trayectoria de fluido, y una abertura entre la segunda trayectoria de fluido y la tercera trayectoria de fluido; y generar una burbuja de cavitación en la primera trayectoria de fluido que deforma elásticamente una porción de la membrana flexible (por ejemplo, una membrana fabricada con un material elastomérico (por ejemplo, polidimetilsiloxano (PDMS), plastómeros de poliolefina (POP), perfluoropolietileno (a-PFPE), poliuretano, poliimidas y la resina NOVOLAC® reticulada (polímero de formaldehído fenólico), y similares)) en la segunda trayectoria de fluido, en la que la deformación elástica de la porción de la membrana flexible imparte la suficiente velocidad y/o impulso y/o desplazamiento a una porción del segundo fluido para extruir una gotita del segundo fluido a través de la abertura y hacia la tercera trayectoria de fluido. En ciertas realizaciones, el segundo fluido y el tercer fluido son fluidos inmiscibles. En ciertas realizaciones, el segundo fluido es un fluido acuoso y el tercer fluido es un disolvente orgánico o un aceite. En ciertas realizaciones, el segundo fluido es un fluido acuoso y el tercer fluido es un disolvente orgánico o un aceite. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente la monitorización del fluido en la segunda trayectoria de fluido y la transmisión de los datos generados mediante dicha monitorización a un controlador.

En varias realizaciones se proporcionan dispositivos para la generación de gotitas. En ciertas realizaciones, los dispositivos comprenden una primera trayectoria de fluido; una segunda trayectoria de fluido; una abertura entre la primera trayectoria de fluido y la segunda trayectoria de fluido, estando la abertura dispuesta de tal forma que la formación de una burbuja en un fluido en la primera trayectoria de fluido induce una fuerza en la en una cantidad eficaz para extruir así una gotita del fluido desde la primera trayectoria de fluido a través de la abertura hacia la segunda trayectoria de fluido; y un controlador acoplado a una fuente de energía que está y configurado operativamente para causar que la fuente de energía dirija la energía que induce la formación temporal de una o más burbujas en la primera trayectoria de fluido. En ciertas realizaciones, la burbuja es una burbuja de cavitación. En ciertas realizaciones, la abertura está configurada como una boquilla. En ciertas realizaciones, la fuente de energía un láser de pulsos. En ciertas realizaciones, el controlador está configurado para ajustar el volumen de la gotita en función de al menos uno de una intensidad del pulso de láser, una duración del pulso de láser, una longitud de onda del pulso de láser y una posición del pulso de láser en el interior del primer canal de fluido.

En varias realizaciones se proporcionan dispositivos para la generación de gotitas. En ciertas realizaciones, los dispositivos comprenden una primera trayectoria de fluido; una segunda trayectoria de fluido; una tercera trayectoria de fluido; una membrana flexible interpuesta entre la primera trayectoria de fluido y la segunda trayectoria de fluido, estando la membrana flexible dispuesta de tal forma que la formación de una burbuja en un fluido de la primera trayectoria de fluido induce una fuerza que deforma elásticamente una porción de la membrana flexible; una abertura entre la segunda trayectoria de fluido y la tercera trayectoria de fluido, estando la abertura dispuesta de tal forma que

la deformación elástica de una porción de la membrana flexible induce una fuerza en un segundo fluido para extruir así una gotita del segundo fluido desde la segunda trayectoria de fluido a través de la abertura hacia la tercera trayectoria de fluido; y un controlador configurado operativamente para dirigir una energía que induce la formación temporal de la burbuja en el fluido en la primera trayectoria de fluido. En ciertas realizaciones, la burbuja es una burbuja de cavitación. En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende adicionalmente un monitor configurado para monitorizar la segunda o la tercera trayectoria de fluido, y configurado adicionalmente para transferir los datos del monitor al controlador. En ciertas realizaciones, el controlador está configurado adicionalmente para controlar un volumen indicado del segundo fluido en la tercera trayectoria de fluido, estando el volumen indicado determinado al menos en parte por los datos del monitor.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los anteriores métodos y dispositivos, las gotitas son generadas con unas variaciones en el volumen de la gotita de aproximadamente el 10 % o menos, preferentemente de aproximadamente el 5 % o menos, más preferentemente de aproximadamente el 3 % o menos, o de aproximadamente el 2 % o menos, o de aproximadamente el 1 % o menos, a unas velocidades de repetición que varían desde aproximadamente 1 kHz hasta aproximadamente 10 kHz.

#### Breve descripción de los dibujos

- Las Figuras 1A y 1B representan el proceso de creación de una burbuja de cavitación usando un láser de pulsos. La Figura 1A muestra la generación de plasma en el interior de un volumen de fluido como resultado de la irradiación con un pulso de láser focalizado, seguido de la generación de una onda de choque y la expansión y el posterior colapso de la burbuja de cavitación. La Figura 1B muestra una gráfica del curso temporal típico de la expansión y el posterior colapso de una burbuja de cavitación.
- La Figura 2 ilustra el curso temporal de la formación y el posterior colapso de una burbuja de cavitación generada usando un láser de pulsos.
- La Figura 3 ilustra esquemáticamente la generación de gotitas en el interior de un canal de fluido según una realización de la invención.
- La Figura 4 ilustra esquemáticamente la generación de gotitas que incorporan partículas o células en el interior de un canal de fluido según otra realización de la invención.
- La Figura 5 ilustra esquemáticamente la generación de gotitas en el interior de un canal de fluido según otra realización de la invención.
- La Figura 6 ilustra esquemáticamente la generación de gotitas en el interior de un canal de fluido según otra realización de la invención.
- La Figura 7 ilustra esquemáticamente la generación de gotitas que incorporan partículas o células en el interior de un canal de fluido según otra realización de la invención.
- La Figura 8, paneles (a)-(i), muestra una serie de imágenes resueltas en el tiempo de la generación de gotitas a demanda.
- La Figura 9 representa la modulación del volumen de una gotita generada mediante la variación de la energía del pulso de láser y mediante la variación de la ubicación del pulso de láser.
- La Figura 10, paneles (a)-(d), ilustra la generación continua de gotitas en el interior de un canal de fluido usando una serie de pulsos de láser repetidos a diferentes intervalos. La barra de escala tiene una longitud de 100 micrones. El panel (a) ilustra intervalos de 2 milisegundos, el panel (b) ilustra intervalos de 1 milisegundo, el panel (c) ilustra intervalos de 500 microsegundos y el panel (d) ilustra intervalos de 100 microsegundos.
- La Figura 11, paneles a y b, ilustra las gotitas recogidas generadas a diferentes frecuencias del pulso de láser. La barra de escala tiene una longitud de 100 micrones. El panel (a) ilustra las gotitas generadas mediante una frecuencia del pulso de láser de 1 kHz. El panel (b) ilustra las gotitas generadas mediante una frecuencia del pulso de láser de 10 kHz.
- La Figura 12, paneles a-d, ilustra la generación continua de gotitas en el interior de un canal de fluido usando una serie de pulsos de láser repetidos a diferentes intervalos. El panel (a) ilustra intervalos de 2 milisegundos, el panel (b) ilustra intervalos de 1 milisegundo, el panel (c) ilustra intervalos de 500 microsegundos y el panel (d) ilustra intervalos de 100 microsegundos.
- La Figura 13, paneles a-c, representa la encapsulación de una partícula o de una célula en el interior de una gotita generada mediante una burbuja de cavitación. El panel (a) muestra las partículas en el interior de un canal de fluido. El panel (b) muestra la posición de una célula, indicada por una flecha blanca, antes y a diferentes

intervalos temporales después de la inducción de una burbuja de cavitación y la posterior generación de una gotita. El panel (c) ilustra la generación continua de series de gotitas que encapsulan, cada una, una célula.

La Figura 14 ilustra la generación consecutiva de gotitas en el interior de un canal de fluido usando pulsos de láser a una frecuencia de 1 Hz.

5

## **Descripción detallada**

En varias realizaciones se proporcionan dispositivos y métodos para la generación a demanda de gotitas a alta velocidad de gotitas de un volumen controlado que tienen aplicación en particular en el campo de los microfluidos. En varias realizaciones, los métodos y los dispositivos también pueden usarse para encapsular células y/o partículas y/u otras gotitas de fluido.

En varias realizaciones, los dispositivos y los métodos descritos en el presente documento utilizan un nuevo mecanismo de activación controlable que utiliza una energía dirigida que induce unas burbujas de cavitación de vida corta. En algunas realizaciones, esta energía está en forma de un láser de pulsos que proporciona estallidos de energía óptica, cuya intensidad, duración, longitud de onda y/o posición pueden ser controladas.

La Figura 1A ilustra el mecanismo subyacente de la formación de burbujas de cavitación inducidas por un pulso de láser en un medio acuoso. Se focaliza un pulso de láser en un volumen dado de medio acuoso. La absorción de esta energía óptica da como resultado una descomposición de las moléculas de agua en el interior del área del foco, generando una burbuja de plasma próxima al punto focal. Los componentes del plasma se recombinan en unos pocos nanosegundos, generando una onda de choque de energía liberada y una burbuja de vapor explosiva (denominada también burbuja de cavitación) que se expande tan rápido como a 100 metros por segundo, seguido de un rápido colapso. La Figura 1B muestra un curso temporal típico de la formación y el colapso de una burbuja. Puede observarse que el radio de la burbuja aumenta rápidamente hasta aproximadamente 1 microsegundo después del inicio, seguido de un rápido colapso.

La Figura 2 muestra una serie de microfotografías de la formación de burbujas usando este mecanismo de activación. Puede observarse una onda de choque expandiéndose hacia fuera desde el punto de generación del plasma 22 nanosegundos después del inicio. Hay una burbuja de cavitación en rápida expansión fácilmente observable a los 72 nanosegundos, con la burbuja expandiéndose fuera del marco a los 55 microsegundos. Esto está seguido por un rápido colapso de la burbuja, que se completa esencialmente 152 microsegundos después del inicio. La presión en el interior de dicha burbuja puede ser tan alta como de decenas de megapascales o más según se expande la burbuja. Varias propiedades únicas, tales como una rápida actuación de la fuerza motriz (de entre femtosegundos y nanosegundos, dependiendo de la duración del pulso de láser), una rápida conversión de la energía dirigida en potencia mecánica, la gran magnitud de las fuerzas resultantes, el relativamente gran desplazamiento producido por la burbuja de cavitación y la naturaleza extremadamente temporal de las fuerzas implicadas, proporcionan un mecanismo único para una activación ultrarrápida del micro- y el nanofluido. Utilizando este mecanismo de activación, puede conseguirse que los componentes de los micro- y nanofluidos tales como conmutadores, válvulas y bombas guíen, dirijan y regulen los flujos de fluido a unas escalas micro- y nanofluidas con una velocidad y una precisión sin precedentes, permitiendo así unas nuevas funcionalidades.

Una realización ilustrativa de la invención se muestra esquemáticamente en la Figura 3. La figura muestra un dispositivo, que puede ser un dispositivo microfluido, que comprende un primer canal de fluido (320) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un primer fluido (312) y un segundo canal de fluido (310) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un segundo fluido (322), en el que el segundo fluido es inmiscible en el primer fluido y en el que los canales de fluido están en comunicación fluida entre sí a través de una abertura (330). En algunas realizaciones, esta abertura está en forma de una boquilla. Hay una fuente de energía dirigida (340), por ejemplo, un láser de pulsos, dirigida hacia el primer canal de fluido (320). En ciertas realizaciones, el láser puede ser dirigido usando, por ejemplo, un espejo (350) y focalizado en un volumen del primer canal de fluido (320) usando una lente (355). En algunas realizaciones, el espejo y/o la lente están configurados para permitir la focalización de la fuente de energía dirigida en diferentes posiciones en el interior del primer canal de fluido (320). La fuente de energía dirigida (340) inicia la formación de una burbuja temporal (360) (por ejemplo, una burbuja de cavitación) en el interior del primer canal de fluido (320), dirigiendo una gotita del primer fluido (370) hacia el segundo canal de fluido (310). El colapso de la burbuja causa un flujo retrógrado del primer fluido extruido, causando la formación de un "cuello" estrecho y dando lugar rápidamente a la liberación de la gotita (380) en el segundo canal de fluido (310).

En la Figura 8 se muestra una serie de fotografías que muestran la formación y la liberación de una gotita en dicho dispositivo. La Figura 8, panel (a), muestra un conjunto de canales de fluido paralelos conectados por una abertura. La inducción de una burbuja de cavitación se observa en la Figura 8, panel (b), que extruye una porción del contenido de un canal en el otro, como puede observarse en la Figura 8, paneles (c) hasta (e). Cuando la burbuja colapsa, se forma un "cuello" estrecho de fluido de conexión, según se observa en la Figura 8, paneles (f) y (g). Finalmente, este cuello se retrae y la gotita es liberada, según se muestra en la Figura 8, paneles (h) e (i).

65 En la Figura 4 se muestra otra realización de la invención. La figura muestra un dispositivo, que puede ser un dispositivo de microfluido, que comprende un primer canal de fluido (420) (por ejemplo, un microcanal) que contiene

un primer fluido, un segundo canal de fluido (415) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un segundo fluido (417) y un tercer canal de fluido (410) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un tercer fluido (412), en el que el segundo fluido es inmiscible en el tercer fluido y en el que el segundo canal de fluido y el tercer canal de fluido están en comunicación fluida entre sí a través de una abertura (430). En algunas realizaciones, esta abertura está en forma de una boquilla. En ciertas realizaciones, el segundo fluido puede incluir partículas o células (416), y puede ser inmiscible en el primer fluido en virtud del flujo laminar y/o en virtud de la inmiscibilidad química. Se dirige una fuente de energía dirigida (440), por ejemplo, un láser de pulsos, hacia el primer canal de fluido (420), opcionalmente usando un espejo (450) y dirigido, y opcionalmente focalizado, en un volumen del primer canal de fluido (420) usando, por ejemplo, una lente (455). En algunas realizaciones, el espejo y/o la lente están configurados para permitir la focalización de la fuente de energía dirigida en diferentes posiciones en el interior del primer canal de fluido (420). La fuente de energía dirigida (440) inicia la formación de una burbuja temporal (460) (por ejemplo, una burbuja de cavitación) en el interior del primer canal de fluido (420), dirigiendo una gotita del segundo fluido (470) hacia el tercer canal de fluido (410). El colapso de la burbuja causa un flujo retrógrado del segundo fluido extruido, causando la formación de un "cuello" estrecho y dando lugar rápidamente a la liberación de la gotita (480) en el tercer canal de fluido (410).

En la Figura 5 se muestra otra realización ilustrativa. La figura muestra un dispositivo, que puede ser un dispositivo de microfluído, que comprende un primer canal de fluido (520) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un primer fluido (522), un segundo canal de fluido (515) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un segundo fluido (517) y un tercer canal de fluido (510) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un tercer fluido (512), en el que el segundo fluido es inmiscible en el tercer fluido y en el que el segundo canal de fluido y el tercer canal de fluido están en comunicación fluida entre sí a través de una abertura (530). En algunas realizaciones, esta abertura está en forma de una boquilla. El segundo fluido puede incluir partículas o células (516) que pueden ser posteriormente encapsuladas en la gotita de fluido generada, y puede estar en comunicación fluida con el primer canal de fluido (520) a través de una abertura (535) o una estructura similar. Hay una fuente de energía dirigida (540), por ejemplo, un láser de pulsos, dirigida hacia el primer canal de fluido (520), opcionalmente usando un espejo (550), y dirigido (y opcionalmente focalizado) a un volumen del primer canal de fluido (520) usando, por ejemplo, una lente (555). En algunas realizaciones, el espejo y/o la lente están configurados para permitir la focalización de la fuente de energía dirigida en diferentes posiciones en el interior del primer canal de fluido (520). La fuente de energía dirigida (540) inicia la formación de una burbuja temporal (560) (por ejemplo, una burbuja de cavitación) en el interior del primer canal de fluido (520), dirigiendo una gotita del segundo fluido (570) hacia el tercer canal de fluido (510). El colapso de la burbuja causa un flujo retrógrado del segundo fluido extruido, causando la formación de un "cuello" estrecho y dando lugar rápidamente a la liberación de la gotita (580) en el tercer canal de fluido (510).

En la Figura 6 se muestra otra realización de la invención. La figura muestra un dispositivo, que puede ser un dispositivo de microfluído, que comprende un primer canal de fluido (620) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un primer fluido (622), un segundo canal de fluido (615) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un segundo fluido (617) y un tercer canal de fluido (610) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un tercer fluido (612), en el que el segundo fluido es inmiscible en el tercer fluido y en el que el segundo canal de fluido y el tercer canal de fluido están en comunicación fluida entre sí a través de una abertura (630). En algunas realizaciones, esta abertura está en forma de una boquilla. Hay una membrana flexible (635) interpuesta entre el primer canal de fluido (620) y el segundo canal de fluido (615). Hay una fuente de energía dirigida (640), por ejemplo, un láser de pulsos, dirigida hacia el primer canal de fluido (520), opcionalmente usando un espejo (650) y focalizada en un volumen del primer canal de fluido (620) opcionalmente usando una lente (655). En algunas realizaciones, el espejo y/o la lente están configurados para permitir la focalización de la fuente de energía dirigida en diferentes posiciones en el interior del primer canal de fluido (620). La fuente de energía dirigida (640) inicia la formación de una burbuja temporal (660) (por ejemplo, una burbuja de cavitación) en el interior del primer canal de fluido (620), que da como resultado una deformación elástica de la membrana flexible (635). Esta deformación elástica dirige una gotita del segundo fluido (670) hacia el tercer canal de fluido (610). La reversión de la deformación elástica después del colapso de la burbuja (660) da como resultado un flujo retrógrado del segundo fluido extruido, causando la formación de un "cuello" estrecho y dando lugar rápidamente a la liberación de la gotita (680) en el tercer canal de fluido (610). El tiempo de respuesta de esta configuración puede ser controlado por la rigidez de la membrana elástica, además de los otros parámetros analizados anteriormente.

En la Figura 7 se muestra otra realización más de la invención. La figura muestra un dispositivo, que puede ser un dispositivo de microfluído, que comprende un primer canal de fluido (720) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un primer fluido (720), un segundo canal de fluido (715) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un segundo fluido (717) y un tercer canal de fluido (710) (por ejemplo, un microcanal) que contiene un tercer fluido (712), en los que el primer, el segundo y el tercer fluido son inmiscibles (por ejemplo, en virtud del flujo laminar y/o de una inmiscibilidad química). El segundo fluido puede incluir partículas o células (716) que pueden ser posteriormente encapsuladas en la gotita de fluido generada. Hay una fuente de energía dirigida (740), por ejemplo, un láser de pulsos, dirigida hacia el primer canal de fluido (720), opcionalmente usando un espejo (750), y focalizada en un volumen del primer canal de fluido (720), opcionalmente usando una lente (755). En algunas realizaciones, el espejo y/o la lente están configurados para permitir la focalización de la fuente de energía dirigida en diferentes posiciones en el interior del primer canal de fluido (720). La fuente de energía dirigida (740) inicia la formación de una burbuja temporal (760) (por ejemplo, una burbuja de cavitación) en el interior del primer canal de fluido (720), dirigiendo una gotita del

segundo fluido (770) hacia el tercer canal de fluido (710). El colapso de la burbuja causa un flujo retrógrado del segundo fluido extruido, causando la formación de un "cuello" estrecho y dando lugar rápidamente a la liberación de la gotita (780) en el tercer canal de fluido (710).

- 5 Aunque anteriormente se ha mencionado el uso de un láser de pulsos como una fuente de energía dirigida, debería mencionarse que otras fuentes de energía son adecuadas para su uso con la invención. Algunas fuentes de energía dirigida alternativas incluyen fuentes ópticas sin láser de alta potencia (por ejemplo, lámparas de arco focalizadas), y radiación de microondas, calentamiento por inducción y energía acústica (por ejemplo, ultrasonidos).
- 10 En ciertas realizaciones se prefieren los láseres de pulso como fuentes de energía. Los láseres son ventajosos porque no requieren ningún cableado eléctrico o mecánico ni ninguna interconexión para proporcionar energía. Un haz de láser puede ser focalizado en cualquier ubicación tridimensional arbitraria a través de un sustrato transparente. Esto elimina los problemas de interfase y facilita la integración con chips microfluidos de fundición convencionales.
- 15 Algunos láseres ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, láser de pulsos de nanosegundo con una longitud de onda, por ejemplo, a 532 nm. También pueden aplicarse láseres de pulsos de microsegundo, de picosegundo o de femtosegundo, y similares. En ciertas realizaciones, la longitud de onda del láser también puede estar en el UV, el visible o el infrarrojo cercano.
- 20 En ciertas realizaciones, los dispositivos o los sistemas que comprenden los dispositivos, pueden incorporar un dispositivo de monitorización que caracteriza el contenido de uno o más de los canales de fluido. Los datos de este dispositivo de monitorización pueden ser transmitidos a un controlador, que a su vez puede estar configurado para activar la fuente de energía dirigida basándose en los datos recibidos del monitor. Por ejemplo, puede alinearse un monitor de fluorescencia con un canal de fluido que contiene células o partículas marcadas con fluorescencia.
- 25 Cuando los datos del monitor indican que una célula que contiene el marcador fluorescente deseado está alineada con el mecanismo de generación de la gotita, el controlador puede iniciar un pulso de láser que dé como resultado la formación de una gotita que encapsule la célula deseada. De forma análoga, puede usarse la absorbancia para diferenciar el contenido de una corriente de fluido monitorizada. Esta disposición permite ventajosamente la selección de unos volúmenes específicos en el interior de un canal de fluido que puede tener un contenido único o deseable para su transferencia a un segundo canal de fluido para la recolección o la distribución a otra área funcional del dispositivo. Los monitores no se limitan a monitores de fluorescencia o de absorbancia. Por ejemplo, de forma similar pueden usarse ventajosamente monitores magnéticos, monitores de capacitancia, monitores de inductancia, monitores electroquímicos.
- 30
- 35 Se apreciará que, aunque en ciertas realizaciones, puede haber una o más de las corrientes de fluido (por ejemplo, trayectorias de fluido) confinadas en el interior de canales físicos (por ejemplo, microcanales), no es necesario que las corrientes de fluido estén restringidas o separadas por una barrera física/pared del canal. En ciertas realizaciones, las corrientes de fluido pueden estar confinadas y/o separadas y/o dirigidas a lo largo de las trayectorias predeterminadas mediante variaciones en la polaridad/hidrofobicidad/energía libre superficial de la superficie sobre la que están dispuestas (véase, por ejemplo, Zhao et al. (2002) Anal. Chem., 74 (16): 4259-4268), mediante el uso de técnicas de electrohumedecimiento (véase, por ejemplo, Cheng y Hsiung (2004) Biomedical Microdevices, 6(5): 341-347), mediante un medio electrocinético, mediante el uso de un flujo laminar dirigido (por ejemplo, mediante el ajuste de los caudales y/o de la sección transversal de la corriente y/o de la viscosidad de la corriente), y similares.
- 40
- 45
- 50 En ciertas realizaciones, las corrientes de fluido son corrientes de microfluidos. Una "corriente de un microfluído" se refiere a una corriente en la que al menos aproximadamente el 40 %, o al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 %" o al menos aproximadamente el 70 %" o al menos aproximadamente el 80 %" o al menos aproximadamente el 90 %" o al menos aproximadamente el 95 %" o al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, del flujo o de la masa de dicha corriente de fluido pasa a través de un área de sección transversal que tiene al menos una dimensión característica (por ejemplo, la anchura o el diámetro) de menos de 1.000 µm, más preferentemente de menos de aproximadamente 900 µm, o de menos de aproximadamente 800 µm, o de menos de aproximadamente 700 µm, o de menos de aproximadamente 600 µm, o de menos de aproximadamente 500 µm, o de menos de aproximadamente 400 µm, o de menos de aproximadamente 300 µm, o de menos de aproximadamente 250 µm, o de menos de aproximadamente 200 µm, o de menos de aproximadamente 150 µm, o de menos de aproximadamente 100 µm, o de menos de aproximadamente 75 µm, o de menos de aproximadamente 50 µm, o de menos de aproximadamente 40 µm, o de menos de aproximadamente 30 µm, o de menos de aproximadamente 20 µm, o de menos de aproximadamente 10 µm, o de menos de aproximadamente 1 µm. En ciertas realizaciones, la "corriente de un microfluído" se refiere a una corriente de fluido contenida en el interior de un canal de microfluído.
- 55
- 60
- 65 En ciertas realizaciones, una o más de las corrientes de fluido están dispuestas en un canal o en un microcanal. Los términos "microcanal de fluido" o "microcanal" se usan de forma intercambiable y se refieren a un canal que tiene al menos una dimensión característica (por ejemplo, la anchura o el diámetro) de menos de 1.000 µm, más preferentemente de menos de aproximadamente 900 µm, o de menos de aproximadamente 800 µm, o de menos de

aproximadamente 700 µm, o de menos de aproximadamente 600 µm, o de menos de aproximadamente 500 µm, o de menos de aproximadamente 400 µm, o de menos de aproximadamente 300 µm, o de menos de aproximadamente 250 µm, o de menos de aproximadamente 200 µm, o de menos de aproximadamente 150 µm, o de menos de aproximadamente 100 µm, o de menos de aproximadamente 75 µm, o de menos de aproximadamente 50 µm, o de menos de aproximadamente 40 µm, o de menos de aproximadamente 30 µm, o de menos de aproximadamente 20 µm.

En ciertas realizaciones, los métodos y los dispositivos descritos en el presente documento pueden utilizar fluidos inmiscibles. En este contexto, cuando se usa el término "inmiscible" con respecto a dos fluidos, indica que cuando se mezclan los fluidos en alguna proporción, no forman una solución. Algunos materiales inmiscibles clásicos son agua y aceite. Los fluidos inmiscibles, según se usa en el presente documento también incluyen fluidos que no forman sustancialmente una solución cuando se combinan en alguna proporción. Habitualmente los materiales son sustancialmente inmiscibles cuando no forman una solución si se combinan en proporciones iguales. En ciertas realizaciones, los fluidos inmiscibles incluyen fluidos que no son significativamente solubles entre sí, fluidos que no se mezclan durante un periodo de tiempo debido a propiedades físicas tales como la densidad o la viscosidad, y fluidos que no se mezclan durante periodos de tiempo debido al flujo laminar.

Además, dichos fluidos no están restringidos a líquidos, sino que pueden incluir líquidos y gases. Por lo tanto, por ejemplo, cuando van a formarse gotitas que comprenden un disolvente acuoso (tal como agua) se contempla cualquiera de los diversos compuestos orgánicos tales como tetracloruro de carbono, cloroformo, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, diclorometano, éter dietílico, dimetilformamida, acetato de etilo, heptano, hexano, metil-terc-butíl éter pentano, tolueno, 2,2,4-trimetilpentano, y similares. Varios sistemas disolventes mutuamente insolubles son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, la Tabla 1). En otro ejemplo, pueden producirse gotitas de un tampón acuoso que contiene unas cantidades fisiológicamente normales de soluto en un tampón acuoso denso que contiene unas elevadas concentraciones de sacarosa. En otro ejemplo más, pueden producirse gotitas de un tampón acuoso que contiene unas cantidades fisiológicamente normales de un soluto en un segundo tampón acuoso que contiene unas cantidades fisiológicamente normales del soluto, en el que los dos tampones están segregados por un flujo laminar. Todavía en otro ejemplo, pueden producirse gotitas de un fluido en un gas tal como nitrógeno o aire.

La Tabla 1 ilustra varios disolventes que son miscibles o inmiscibles entre sí. El disolvente de la columna izquierda no se mezcla con los disolventes de la columna derecha, salvo que se indique de otro modo.

Disolventes	Inmiscibilidad
acetona	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda
acetonitrilo	ciclohexano, heptano, hexano, pentano, 2,2,4-trimetilpentano
tetracloruro de carbono	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda excepto agua
cloroformo	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda excepto agua
ciclohexano	acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, metanol, agua
1,2-dicloroetano	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda excepto agua
diclorometano	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda excepto agua
éter dietílico	dimetilsulfóxido, agua
dimetilformamida	ciclohexano, heptano, hexano, pentano, 2,2,4-trimetilpentano, agua
dimetilsulfóxido	ciclohexano, heptano, hexano, pentano, 2,2,4-trimetilpentano, éter dietílico
1,4-dioxano	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda
etanol	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda
acetato de etilo	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda excepto agua
heptano	acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, metanol, agua
hexano	acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, metanol, ácido acético, agua
metanol	ciclohexano, heptano, hexano, pentano, 2,2,4-trimetilpentano
metil-terc-butíl éter	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda excepto agua
pentano	acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, metanol, agua, ácido acético
1-propanol	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda
2-propanol	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda

(continuación)

Disolventes	Inmiscibilidad
tetrahidrofurano	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda
tolueno	puede mezclarse con cualquiera de los disolventes indicados en la columna de la izquierda excepto agua
2,2,4-trimetilpentano	acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, metanol, agua
agua	tetracloruro de carbono, cloroformo, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, diclorometano, éter dietílico, dimetilformamida, acetato de etilo, heptano, hexano, metil-terc-butil éter, pentano, tolueno, 2,2,4-trimetilpentano

En ciertas realizaciones, no es necesario que el primer fluido y el segundo fluido sean inmiscibles entre sí. En dichas realizaciones, las gotitas inyectadas pueden mantenerse separadas entre sí simplemente mediante el ajuste de los caudales de los microcanales y de la velocidad de formación de la burbuja, para formar burbujas separadas.

En varias realizaciones, las gotitas generadas por los dispositivos y los métodos descritos en el presente documento pueden contener o encapsular una gran diversidad de materiales. En algunas realizaciones, las gotitas pueden contener muestras de prueba, células, orgánulos, proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, reactivos de PCR o de otros ensayos, productos bioquímicos, colorantes o particulados (por ejemplo, microesferas poliméricas, micropartículas metálicas o pigmentos). En otras realizaciones más, una gotita puede encapsular una o más gotitas generadas previamente. Además, no es necesario que la invención esté limitada a sistemas de gotitas acuosas. Por ejemplo, dichos métodos y dispositivos de generación de gotitas pueden usarse en un recubrimiento con nanopartículas, en el que pueden usarse materiales en disolventes orgánicos para depositar capas en, o para encapsular, nanopartículas.

Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones una abertura en un canal de fluido puede estar configurada como una boquilla. La profundidad, el diámetro interno y el diámetro externo de dicha boquilla pueden estar optimizados para controlar el tamaño de la gotita, la uniformidad de la gotita, la mezcla en la interfase de fluidos, o una combinación de estos.

Los dispositivos de generación de gotitas descritos en el presente documento pueden estar provistos sobre un sustrato que difiere del material que comprende los canales de fluido. Por ejemplo, los canales de fluido pueden fabricarse usando un material elastomérico que está dispuesto sobre una superficie rígida. Algunos materiales adecuados para los canales de fluido incluyen, pero no se limitan a, polímeros flexibles tales como PDMS, plásticos, y materiales similares. Los canales de fluido también pueden estar formados por materiales no flexibles tales como plásticos rígidos, vidrio, silicio, cuarzo, metales y materiales similares. Algunos sustratos adecuados incluyen, pero no se limitan a, sustratos transparentes tales como polímeros, plástico, vidrio, cuarzo u otros materiales dieléctricos. Otros materiales de sustrato adecuados incluyen, pero no se limitan a, materiales no transparentes tales como plásticos opacos o translúcidos, silicio, metal, cerámica, y materiales similares.

Los parámetros descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, el (los) caudal(es), la intensidad del láser, la frecuencia/longitud de onda del láser, las dimensiones del canal, las dimensiones del puerto/boquilla, la rigidez de la pared del canal, la ubicación de la formación de la burbuja de cavitación, y similares) pueden ser modificados para optimizar la formación de las gotitas y/o la encapsulación de la gotita/partícula/célula para una aplicación en particular deseada.

Existen diversos formatos, materiales y escalas de tamaño que pueden usarse en la construcción de los dispositivos de generación de gotitas descritos en el presente documento y en los dispositivos de microfluidos que pudieran incorporarlos. En algunas realizaciones, los dispositivos de generación de gotitas y los canales de conexión del fluido están formados por PDMS (o por otros polímeros), y se fabrican mediante el uso de una litografía suave. El PDMS es un material atractivo por diversas razones, que incluyen, pero no se limitan a, el bajo coste, la transparencia óptica, la facilidad de moldeo y el carácter elastomérico. El PDMS también tiene unas características químicas deseables que incluyen compatibilidad con las químicas convencionales del siloxano y con los requisitos de un cultivo celular (por ejemplo, una baja toxicidad, permeabilidad a los gases). En un método de litografía suave ilustrativo, se prepara un molde maestro para formar el sistema de canales de fluido. Este molde maestro puede ser producido mediante un proceso de micromecanizado, un proceso fotolitográfico, o mediante cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la materia. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, grabado en húmedo, deposición a vacío con haz de electrones, fotolitografía, deposición de vapor químico mejorado con plasma, epitaxia de haces moleculares, grabado con iones reactivos y/o molienda con haces iónicos asistida químicamente (Choudhury (1997) *The Handbook of Microlithography, Micromachining, and Microfabrication*, Soc. Photo-Optical Instru. Engineer.; Bard & Faulkner, Fundamentals of Microfabrication).

Una vez preparado, el molde maestro es expuesto a un pro-polímero, que a continuación es curado para formar una réplica estampada en PDMS. La réplica se retira del molde maestro, se recorta y se añaden las entradas de fluido donde se necesiten. La réplica polimérica puede tratarse opcionalmente con un plasma (por ejemplo, un plasma de

O<sub>2</sub>) y pegarse sobre un sustrato adecuado, tal como vidrio. El tratamiento del PDMS con el plasma de O<sub>2</sub> genera una superficie que se precinta hermética e irreversiblemente cuando se pone en un contacto de conformado con un sustrato adecuado, y tiene la ventaja de generar unas paredes del canal de fluido que están cargadas negativamente cuando se usa junto con soluciones acuosas. Estas cargas fijas soportan el bombeo electrocinético

5 que puede usarse para mover el fluido a través del dispositivo. Aunque lo anterior describe la fabricación de un dispositivo de generación de gotitas usando PDMS, debería reconocerse que otros numerosos materiales pueden ser sustituidos por, o usados junto con, este polímero. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, plastómeros de poliolefina, perfluoropolietileno, poliuretano, poliimidas y resinas poliméricas reticuladas de fenol/formaldehído.

- 10 En algunas realizaciones se contemplan dispositivos monocapa. En otras realizaciones se contemplan dispositivos multicapa. Por ejemplo, puede diseñarse una red multicapa de canales de fluidos usando un programa de CAD comercial. Este diseño puede ser convertido en una serie de transparencias que se usan posteriormente como una máscara fotolitográfica para crear un molde maestro. El vaciado de PDMS en este molde maestro produce una réplica polimérica que contiene una red multicapa de canales de fluidos. Este vaciado de PDMS puede ser tratado
- 15 con un plasma y adherido a un sustrato, como se ha descrito anteriormente.

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos y los dispositivos descritos en el presente documento son particularmente adecuados para su uso en dispositivos de microfluidos. En algunas realizaciones, por lo tanto, los canales de fluido son microcanales. Dichos microcanales tienen unas dimensiones características que varían desde aproximadamente 100 nanómetros hasta 1 micrón hasta aproximadamente 500 micrones. En varias realizaciones la dimensión característica varía desde aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 35, 50 o 100 micrones hasta aproximadamente 150, 200, 250, 300 o 400 micrones. En algunas realizaciones, la dimensión característica varía desde aproximadamente 20, 40, o desde aproximadamente 50 micrones hasta aproximadamente 100, 125, 150, 175 o 200 micrones. En varias realizaciones, el espesor de la pared entre canales de fluido adyacentes varía desde aproximadamente 0,1 micrón hasta aproximadamente 50 micrones, o desde aproximadamente 1 micrón hasta aproximadamente 50 micrones, más normalmente desde aproximadamente 5 micrones hasta aproximadamente 40 micrones. En ciertas realizaciones, el espesor de la pared entre canales de fluido adyacentes varía desde aproximadamente 5 micrones hasta aproximadamente 10, 15, 20 o 25 micrones.

- 20
- 30 En varias realizaciones la profundidad de un canal de fluido varía desde 5, 10, 15, 20 micrones hasta aproximadamente 1 mm, 800 micrones, 600 micrones, 500 micrones, 400 micrones, 300 micrones, 200 micrones, 150 micrones, 100 micrones, 80 micrones, 70 micrones, 60 micrones, 50 micrones, 40 micrones o aproximadamente 30 micrones. En ciertas realizaciones, la profundidad de un canal de fluido varía desde aproximadamente 10 micrones hasta aproximadamente 60 micrones, más preferentemente desde aproximadamente 20 micrones hasta
- 35 aproximadamente 40 o 50 micrones. En algunas realizaciones, los canales de fluido pueden estar abiertos; en otras realizaciones los canales de fluido pueden estar cubiertos.

Como se ha mencionado anteriormente, algunas realizaciones de la invención incluyen una boquilla. Cuando hay presente una boquilla, el diámetro de la boquilla puede variar desde aproximadamente 0,1 micrón, o desde aproximadamente 1 micrón hasta aproximadamente 300 micrones, 200 micrones o aproximadamente 100 micrones. En ciertas realizaciones, el diámetro de la boquilla puede variar desde aproximadamente 5, 10, 15 o 20 micrones hasta aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 o aproximadamente 80 micrones. En algunas realizaciones, el diámetro de la boquilla varía desde aproximadamente 1, 5, 10, 15, o 20 micrones hasta

45 aproximadamente 25, 35 o 40 micrones.

45 En algunas realizaciones, los métodos y los dispositivos descritos en el presente documento pueden generar gotitas a una velocidad que varía desde cero gotitas/s, aproximadamente 2 gotitas/s, aproximadamente 5 gotitas/s, aproximadamente 10 gotitas/s, aproximadamente 20 gotitas/s, aproximadamente 50 gotitas/s, aproximadamente 100 gotitas/s, aproximadamente 500 gotitas/s, o aproximadamente 1.000 gotitas/s, hasta aproximadamente 1.500 gotitas/s, aproximadamente 2.000 gotitas/s, aproximadamente 4.000 gotitas/s, aproximadamente 6.000 gotitas/s, aproximadamente 8.000 gotitas/s, aproximadamente 10.000 gotitas/s, aproximadamente 20.000 gotitas/s, aproximadamente 50.000 gotitas/s y aproximadamente 100.000 gotitas/s.

55 En varias realizaciones los dispositivos y los métodos descritos en el presente documento pueden generar unas gotitas que tienen un volumen sustancialmente continuo. El volumen de la gotita puede ser controlado para proporcionar unos volúmenes que varían desde aproximadamente 0,1 fl, aproximadamente 1 fl, aproximadamente 10 fl y aproximadamente 100 fl hasta aproximadamente 1 microlitro, aproximadamente 500 nl, aproximadamente 100 nl, aproximadamente 1 nl, aproximadamente 500 pl o aproximadamente 200 pl. En ciertas realizaciones, el control del volumen de la gotita varía desde aproximadamente 1 pl hasta aproximadamente 150 pl, aproximadamente 200 pl, aproximadamente 250 pl o aproximadamente 300 pl.

60 Como se ha indicado anteriormente, los dispositivos de formación/inyección de gotitas en los microcanales descritos en el presente documento pueden proporcionar un sistema integrado con otros módulos de procesamiento sobre un "chip" microfluido o en flujo a través de sistemas de fabricación para recubrimientos con micropartículas, la formulación de portadores de fármacos microparticulados, y similares. Sin embargo, estos usos son meramente ilustrativos y no limitantes.

En varias realizaciones, los microfluidos que incorporan los componentes/módulos/dispositivos que realizan los métodos descritos en el presente documento pueden manipular unos volúmenes tan pequeños como de entre uno y varios nanolitros. Debido a que el volumen de reacción del microfluído está cercano al tamaño de las células individuales de mamíferos, la pérdida de material se minimiza en el análisis del ARNm de una célula individual con estos dispositivos. La capacidad de procesar células vivas en el interior de los dispositivos de microfluidos proporciona una gran ventaja para el estudio de los transcriptomas de células individuales, debido a que el ARNm es rápidamente degradado con la muerte de la célula. Se ha notificado un dispositivo de microfluído muy integrado ilustrativo, que tiene 26 reactores paralelos de 10 nl para el estudio de la expresión génica en células madre embrionarias humanas (hESC) (Zhong et al. (2008) Lab on a Chip, 8: 68-74; Zhong et al. (2008) Curr. Med. Chem., 15: 2897-2900) y puede ser fácilmente modificado para integrar los dispositivos descritos en el presente documento. Algunos dispositivos de microfluidos ilustrativos incluyen sistemas para la obtención del ADNc de células individuales que incluyen la captura de la célula, la captura/purificación del ARNm, la síntesis/purificación del ADNc, son realizados en el interior del dispositivo. Los presentes dispositivos y métodos ofrecen un medio eficaz para encapsular y/o separar células individuales para, por ejemplo, un procesado adicional, en dichos dispositivos.

Puede usarse cualquiera de las diversas metodologías para conducir los fluidos, o las mezclas de gotitas, partículas, células, etc., a lo largo de las trayectorias del fluido y/o de los canales de los dispositivos descritos en el presente documento. Dichas metodologías incluyen, pero no se limitan a, flujo por gravedad, bombas de jeringa, bombas peristálticas, bombas electrocinéticas, bombas dirigidas por burbujas y bombas dirigidas por aire a presión.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada.

#### Ejemplo 1

##### Generación de gotitas dirigida por una cavitación inducida por un láser de pulsos

Se construyó un dispositivo de generación de gotitas dirigido por un láser de pulsos (PLDG) según se muestra en la Figura 3 usando las técnicas convencionales de litografía suave. El dispositivo de PLDG tenía dos canales de fluido, uno lleno de agua y otro con aceite. Ambos canales de fluido tenían una anchura de 100 micrones y una altura de 100 micrones. Los canales de fluido estaban conectados con una abertura configurada como una boquilla, con un cuello que tenía una anchura de 30 micrones. Los caudales de los canales se ajustaron para producir una interfase estable de aceiteagua.

El funcionamiento de este dispositivo de PLDG se basaba en una burbuja de cavitación inducida por un pulso de láser, generada cuando se focalizaba un pulso de láser intenso en el agua que contiene el canal de fluido. La formación de plasma en el punto focal del pulso de láser genera una burbuja de cavitación que se expande rápidamente, como se ha descrito anteriormente. Esto perturba la interfase de aceiteagua y empuja una gotita de agua hacia el canal de fluido vecino lleno de aceite, para formar gotitas de agua estables. La duración de esta burbuja de cavitación variaba entre decenas y cientos de microsegundos en estos estudios.

Para inducir burbujas de cavitación, se enfocó una de láser de pulsos Nd:YVO4 Q-switch con una longitud de onda de 532 nm, a un ancho de pulso de 15 ns y una frecuencia de repetición máxima de 100 KHz, a través de una lente de un objetivo de 100X en el dispositivo de PLDG. También pueden ser adecuadas otras longitudes de onda, tales como UV, visible e infrarrojo. La generación de gotitas se capturó usando un sistema de imágenes resueltas en el tiempo. La Figura 8 muestra una serie de dichas imágenes obtenidas durante la generación de una gotita. Mediante el uso de aceite de maíz para la fase oleosa continua y de solución salina tamponada con fosfato (PBS) para la fase acuosa, se ajustaron los caudales del aceite de maíz y de la PBS para formar una interfase estable en la abertura de la boquilla (Figura 8, panel (a)). La formación de la burbuja de cavitación es iniciada 1 microsegundo tras el inicio del pulso de láser (Figura 8, panel (b)) y alcanza el tamaño máximo a los 3 microsegundos, empujando la PBS hacia el canal con el aceite de maíz (Figura 8, panel (c)). La burbuja comienza a colapsar después de 5 microsegundos (Figura 8, panel (d)). Al colapsar la burbuja de cavitación se forma un cuello estrecho entre el canal del fluido de la PBS y la gotita extruida (Figuras 8, paneles (d) hasta (f)). Esta conexión se corta debido a la inestabilidad hidrodinámica (Figura 8, panel (g)). Como resultado se generó una gotita de 137 pl usando un pulso de láser de 100 microjulios en aproximadamente 500 microsegundos, después fue transportada por el flujo a través del canal de aceite de maíz (Figura 8, paneles (h) e (i) 8H).

#### Ejemplo 2

##### Control del volumen de las gotitas generadas mediante el PLDG

El volumen del PLDG puede ser controlado puede ser controlado mediante el ajuste de la energía proporcionada por el láser de pulsos, que es función de la intensidad del láser y de la duración del pulso, de la ubicación de la excitación del láser o de una combinación de los anteriores. Alternativamente, la energía del láser de pulsos puede

ser ajustada usando un polarizador de haz.

La Figura 9 ilustra el control del volumen de las gotitas producidas mediante el PLDG mediante el ajuste de estos parámetros. Las gotitas indicadas por la Figura 9, paneles (a) hasta (d), muestran los efectos de variar la energía del láser (Figura 9, panel (a) = 100 microjulios, panel (b) = 90 microjulios, panel (c) = 80 microjulios, panel (d) = 70 microjulios) a una distancia fija de 47 micrones desde las boquillas. Esto produce unos tamaños controlados en la gotita que varían desde aproximadamente 55 hasta aproximadamente 5 micrones, disminuyendo al disminuir la energía del láser.

El control del tamaño de la gotita se muestra en la Figura 9 en los paneles (e) hasta (g), en la que la energía del láser se mantiene constante a 100 microjulios y la distancia desde el punto focal hasta la boquilla se ajusta a entre aproximadamente 40 micrones y aproximadamente 80 micrones. El tamaño de la gotita disminuye desde aproximadamente 60 micrones hasta aproximadamente 25 micrones según se aleja el punto del foco de la interfase del aceite de maíz/PBS. Mediante el uso de una combinación de la energía del láser y la distancia al punto focal desde la interfase fluida, puede controlarse el volumen de la gotita a entre 1 pl y 150 pl.

### Ejemplo 3

#### Uniformidad del tamaño de las gotitas producidas mediante el PLDG

Dado que es una metodología a demanda, el PLDG puede producir gotitas a diferentes frecuencias mediante el control del intervalo entre los pulsos de láser. La Figura 10 muestra los resultados de la generación continua de gotitas a diferentes intervalos de excitación que varían desde 2 ms (Figura 10, panel (a)) hasta 100 microsegundos (Figura 10, panel (d)). El caudal del canal de fluido que recibe las gotitas se ajustó para mantener las gotitas dispersadas a unas elevadas velocidades de generación de gotitas.

La Figura 11 muestra unas gotitas ilustrativas recogidas a unas frecuencias de generación de gotitas de 1 kHz (panel (a)) y de 10 kHz (panel (b)). El tamaño de la gotita era uniforme a pesar de la diferencia de 10 veces en la velocidad a la que se forman las gotitas. La Figura 12 muestra los resultados de un estudio similar, en el que el intervalo entre las excitaciones de láser se estableció en 2 ms (panel (a)), en 500 microsegundos (panel (b)) y en 100 microsegundos (panel (c)). Los datos recogidos a partir de las gotitas generadas a unos intervalos de 500 microsegundos (2 kHz) mostraron una variación en el volumen del 0,689 %.

La generación continua de gotitas a diferentes intervalos de excitación del láser se muestra en la Figura 14, con unos intervalos de excitación de 2 ms (panel (a)), de 500 microsegundos (panel (b)) y de 100 microsegundos (panel (c)). Mediante el uso de un intervalo de pulsos de 100 microsegundos y de una potencia del láser de 90 microjulios, puede conseguirse una velocidad uniforme de producción de gotitas de 10 kHz.

### Ejemplo 4

#### Encapsulación en gotitas mediante el PLDG

Dado que es una metodología a demanda que también permite el control del volumen de la gotita, el PLDG permite la encapsulación de un contenido específico de un canal de fluido en forma de gotitas en un segundo canal de fluido.

Un ejemplo de dicha aplicación es la encapsulación de una única partícula o célula indicada desde una corriente de partículas o de células que pasa a través de un dispositivo de PLDG, dirigida por un controlador que se basa en los datos recibidos de un monitor. Dicha partícula o célula podría ser aislada en el interior de una gotita de medio de crecimiento y llevada por un segundo canal de fluido para una caracterización adicional.

Esto se muestra en la Figura 13. En la Figura 13, panel (a), las partículas (indicadas por flechas blancas) se muestran en el canal de fluido s de un dispositivo de PLDG. La generación de la gotita de encapsulación se muestra en la Figura 13, panel (b). Puede observarse que la gotita que está extruyendo a través de la boquilla 250 microsegundos después de la inducción de la burbuja de cavitación, encierra una partícula. La Figura 13, panel (c), muestra los resultados de un estudio similar, con una captura continua de células. La encapsulación de células HeLa vivas de esta forma muestra unas elevadas tasas de viabilidad (92,07 %). La fiabilidad del dispositivo de PLDG se ha comprobado mediante la aplicación continua de pulsos de láser a una velocidad de 10 kHz durante una hora, lo que se corresponde con la generación de 3,6 millones de generaciones de burbujas de cavitación, sin ningún daño observable en el dispositivo.

Se han divulgado los métodos y los dispositivos de generación de gotitas que son particularmente adecuados para su uso en los dispositivos de microfluidos. Éstos proporcionan una rápida generación a demanda de gotitas a unas velocidades tan altas como de 100 kHz. El volumen de la gotita puede ser ajustado, y se ha demostrado que es muy reproducible, con unas diferencias en el volumen de menos del 1 %. Los dispositivos divulgados no utilizan partes mecánicas, y el uso de una fuente de energía dirigida ubicada externamente (por ejemplo, un láser de pulsos) simplifica en gran medida el diseño tanto del dispositivo como del equipo de soporte. También debería apreciarse que la eficacia y la inherente simplicidad de la metodología del PLDG pueden tener utilidad fuera del campo de los

microfluidos. La elevada velocidad de producción de las gotitas y la estrecha distribución de tamaños de las gotitas resultantes indican que dichos métodos y dispositivos pueden tener utilidad en la preparación de emulsiones en las que la uniformidad en el tamaño de la gotita es primordial. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, productos farmacéuticos, incluyendo composiciones de vacuna. La elevada velocidad de producción de las gotitas y 5 la capacidad de controlar el volumen de las gotitas según son extruidas indican que dichos métodos y dispositivos pueden tener utilidad en la deposición de las gotitas generadas a lo largo de una interfase de fluido/gas y sobre superficies sólidas, depositando y localizando así un contenido de la gotita no volátil. Algunos ejemplos de dichos usos incluyen, pero no se limitan a, la impresión de alta resolución y la generación de micromatrices. Sin embargo, 10 debería ser evidente para los expertos en la materia que son posibles muchas más modificaciones aparte de las ya descritas sin desviarse de los conceptos inventivos del presente documento

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento tienen únicamente fines ilustrativos, y que a las personas expertas en la materia se les sugerirán diversas modificaciones o cambios, y pretenden estar incluidos en el alcance de esta solicitud y en el ámbito de las reivindicaciones anexas. Debería 15 interpretarse que los términos "comprende" y "que comprende" se refieren a elementos, componentes o etapas de una forma no exclusiva, lo que indica que los elementos, componentes o etapas referenciados pueden estar presentes, o ser utilizados o combinados, con otros elementos, componentes o etapas que no están expresamente referenciados.

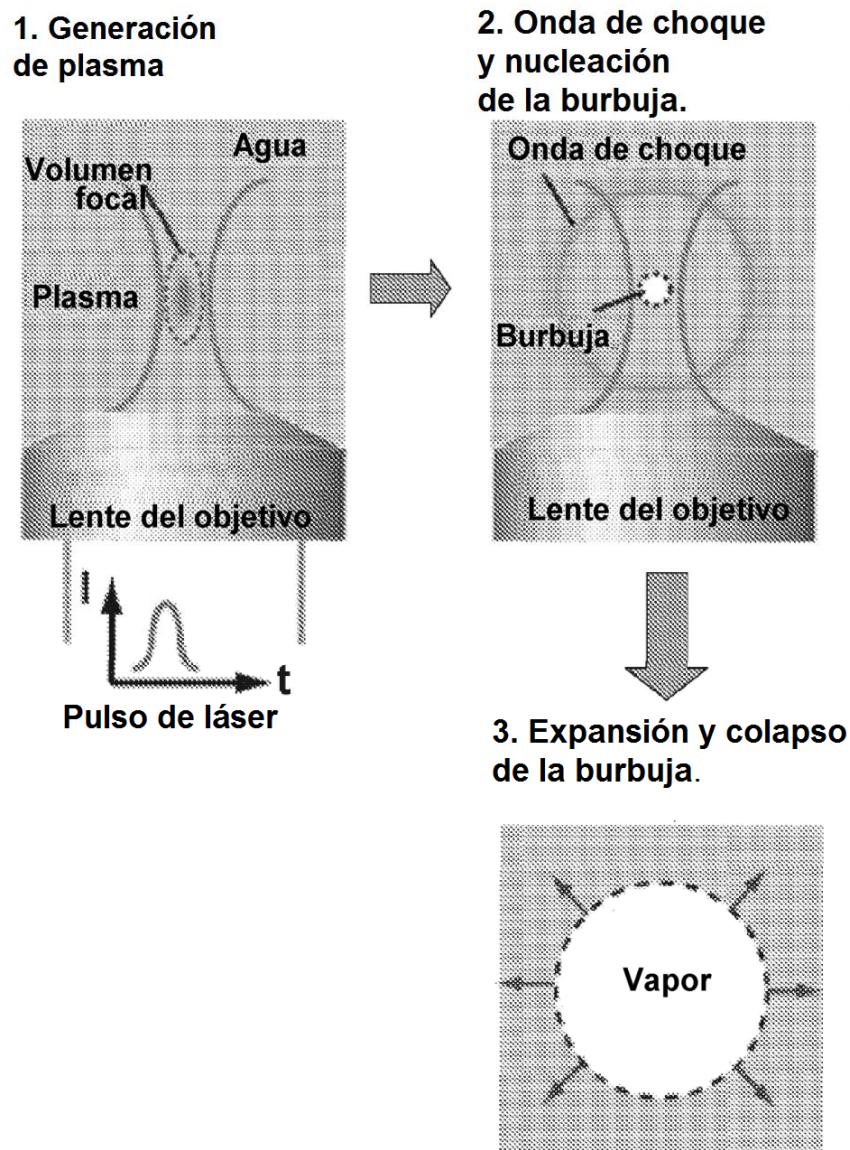
## REIVINDICACIONES

1. Un método de movilización de una cantidad controlada de un fluido que comprende:  
proporcionar:

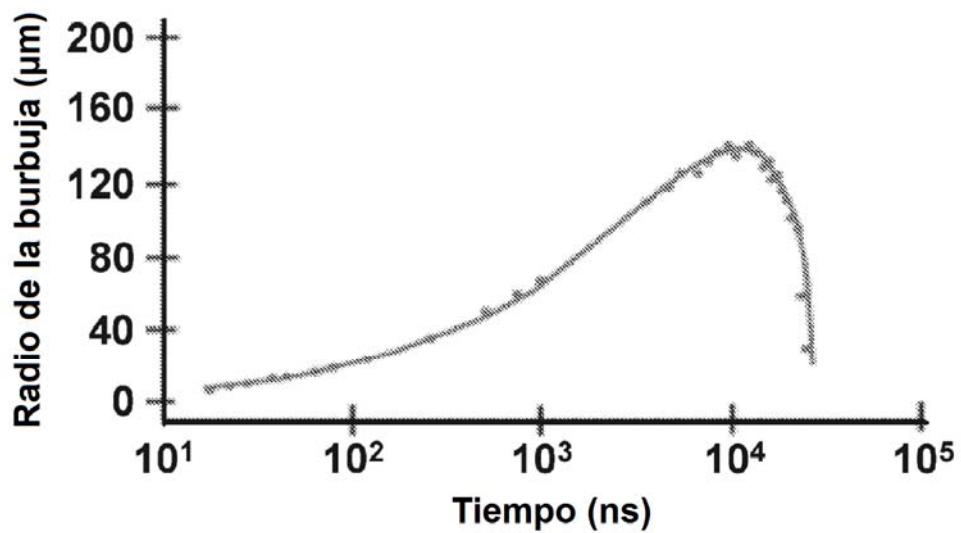
- 5       una primera corriente de fluido (720) que comprende un primer fluido (722) que fluye en un flujo laminar;  
       una segunda corriente de fluido (715) que comprende un segundo fluido (717) que fluye en un flujo laminar adyacente a dicha primera corriente de fluido (720); y  
       una tercera corriente de fluido (710) que comprende un tercer fluido (712) que fluye en un flujo laminar adyacente a dicha segunda corriente de fluido (715) de modo que dicha segunda corriente de fluido (715) se dispone entre dicha primera corriente de fluido (720) y dicha tercera corriente de fluido (710);  
       en donde dicha primera corriente de fluido (720), dicha segunda corriente de fluido (715), y dicha tercera corriente de fluido (710) se separan por polaridad o hidrofobicidad o energía libre superficial de la superficie sobre la que están dispuestas, o mediante el uso de técnicas de electrohumedecimiento o mediante el uso de flujo laminar dirigido;
- 10      el uso de un láser de pulsos (740) para generar una burbuja de cavitación (760) en dicho primer fluido (722),  
       en donde la burbuja de cavitación (760) imparte una velocidad suficiente a una porción del primer fluido (722) para mover de este modo un volumen controlado de dicho segundo fluido (717) que está operativamente acoplado al primer fluido (722) en la tercera corriente de fluido (710) para formar una gotita de volumen controlado (770) en dicha tercera corriente de fluido (710);  
       en donde el volumen controlado del segundo fluido (717) es de aproximadamente 1 microlitro o menos; y  
       en donde la burbuja de cavitación (760) tiene una duración de aproximadamente 1 milisegundo o menos; y  
       en donde la burbuja de cavitación (760) se genera mediante irradiación de un volumen del primer fluido (722) con el láser de pulsos (740).
- 15      2. El método de la reivindicación 1, en donde el primer fluido (722) y el segundo fluido (717) están en comunicación fluida.
- 20      3. El método de la reivindicación 2, en donde la primera corriente de fluido (720), la segunda corriente de fluido (715) y la tercera corriente de fluido (710) se separan mediante flujo laminar dirigido.
- 25      4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde los fluidos primero y segundo (722, 717) son inmiscibles.
- 30      5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende además una etapa de controlar el volumen controlado del segundo fluido (717) usando un controlador que ajusta al menos uno del tiempo del ritmo al que se producen los pulsos emitidos por el láser de pulsos (740), la frecuencia a la que se producen los pulsos emitidos por el láser de pulsos (740), la longitud de onda de los pulsos emitidos por el láser de pulsos (740), la energía de los pulsos emitidos por el láser de pulsos (740) y el objetivo o la ubicación de los pulsos emitidos por el láser de pulsos (740).
- 35      6. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente generar una pluralidad de burbujas de cavitación separadas y adicionales a una frecuencia de al menos 1000 Hz.
- 40      7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el volumen controlado del segundo fluido (715) es aproximadamente 500 nanolitros o menos, o el volumen controlado del segundo fluido (715) es aproximadamente 200 pl o menos.
- 45      8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende seleccionar al menos una de una intensidad, duración, longitud de onda y posición del láser de pulsos (740) para producir de este modo un volumen deseado de la gotita (770).
- 50      9. Un dispositivo para generar gotitas que comprende:
- 55        una primera corriente de fluido (720) que comprende un primer fluido (722) que fluye en un flujo laminar;  
       una segunda corriente de fluido (715) que comprende un segundo fluido (717) que fluye en un flujo laminar adyacente a dicha primera corriente de fluido (720); y  
       una tercera corriente de fluido (710) que comprende un tercer fluido (712) que fluye en un flujo laminar adyacente a dicha segunda corriente de fluido (715) de modo que dicha segunda corriente de fluido (715) se dispone entre dicha primera corriente de fluido (720) y dicha tercera corriente de fluido (710);  
       en donde dicha primera corriente de fluido (720), dicha segunda corriente de fluido (715) y dicha tercera corriente de fluido (710) se separan mediante polaridad o hidrofobicidad o energía libre superficial de la superficie sobre la que se disponen, o mediante el uso de técnicas de electrohumedecimiento o mediante el uso de flujo laminar dirigido; y  
       un controlador acoplado a un láser de pulsos (740) que está configurado para inducir la formación temporal de una o más burbujas de cavitación (760) en la primera trayectoria del fluido (720) mediante dicho láser de pulsos

(740) y configurado para ser usado por el método de acuerdo con la reivindicación 1.

10. El dispositivo de la reivindicación 9, en donde:  
dicho controlador permite que dicha energía se dirija a un ritmo programable: y/o dicho controlador ajusta al menos uno del ritmo al que se producen los pulsos emitidos por el láser de pulsos (740), la frecuencia a la que se producen los pulsos emitidos por el láser de pulsos (740), la longitud de onda de los pulsos emitidos por el láser de pulsos (740), la energía de los pulsos emitidos por el láser de pulsos (740) y el objetivo o la ubicación de los pulsos emitidos por el láser de pulsos (740).
- 10 11. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, que comprende además un monitor configurado para monitorizar la segunda o la tercera trayectoria de fluido (715, 710), y configurado adicionalmente para transferir los datos del monitor al controlador.
- 15 12. El dispositivo de la reivindicación 11, en donde el controlador está adicionalmente configurado para controlar un volumen designado del segundo fluido (717) en la tercera trayectoria de fluido (710), estando determinado el volumen designado al menos en parte por los datos del monitor.
- 20 13. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde dicha primera trayectoria de fluido (720), dicha segunda trayectoria de fluido (715) y dicha tercera trayectoria de fluido se separan mediante el uso de flujo laminar dirigido.

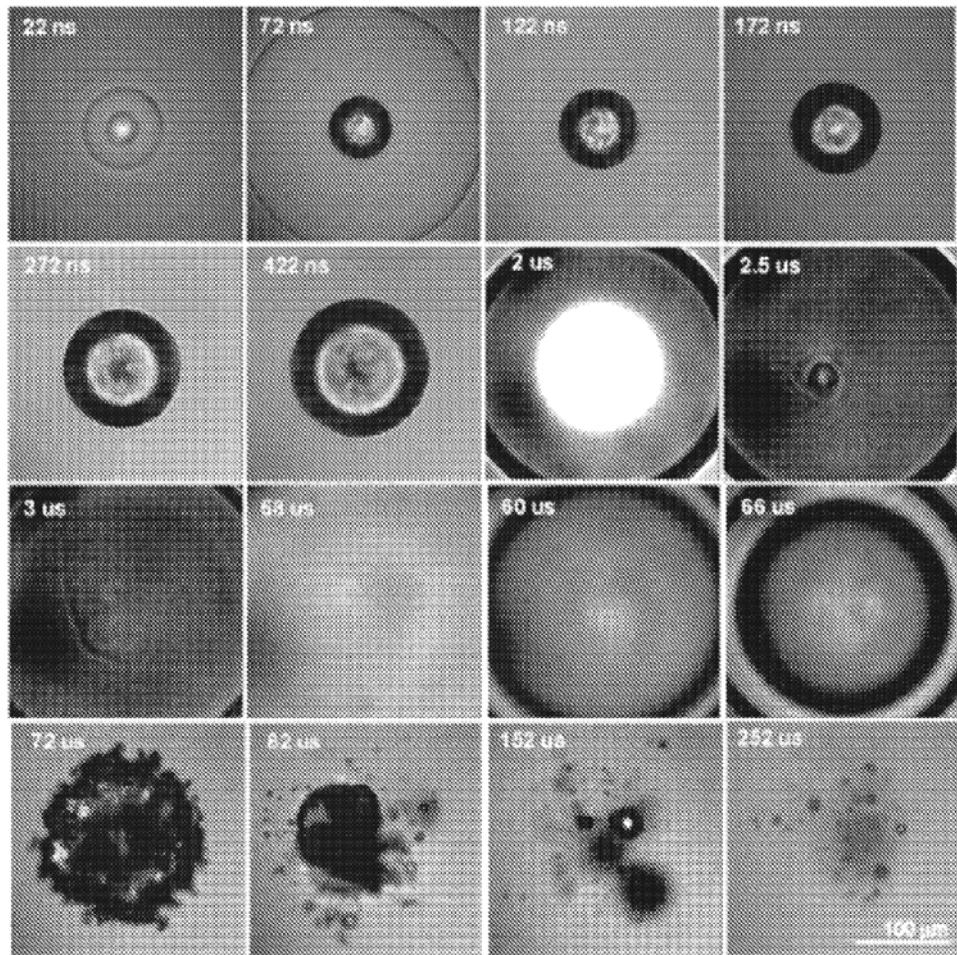


**Fig. 1A**

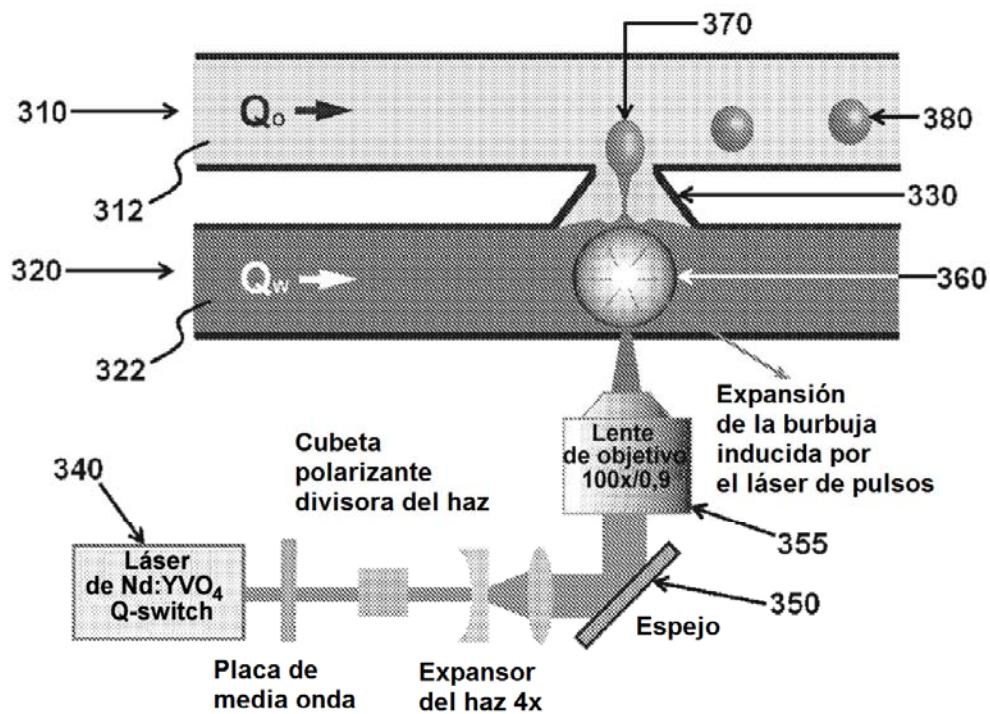


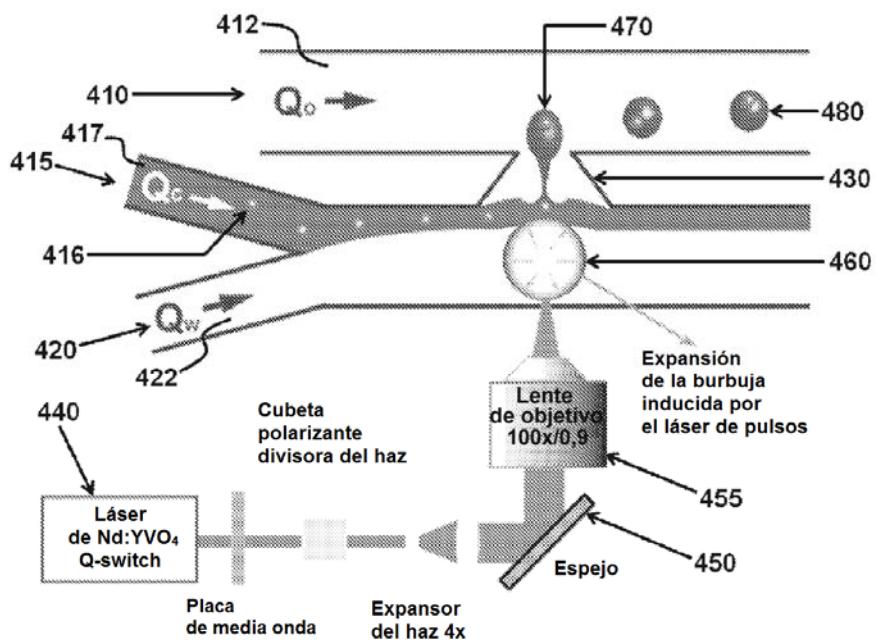
*Fig. 1B*

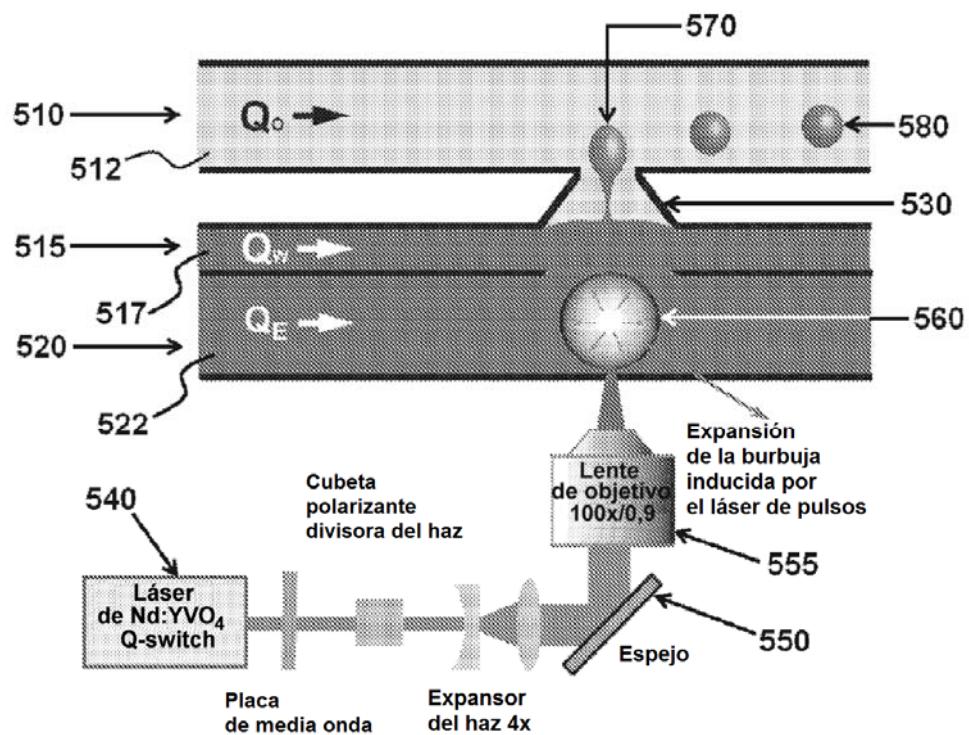
ES 2 832 486 T3

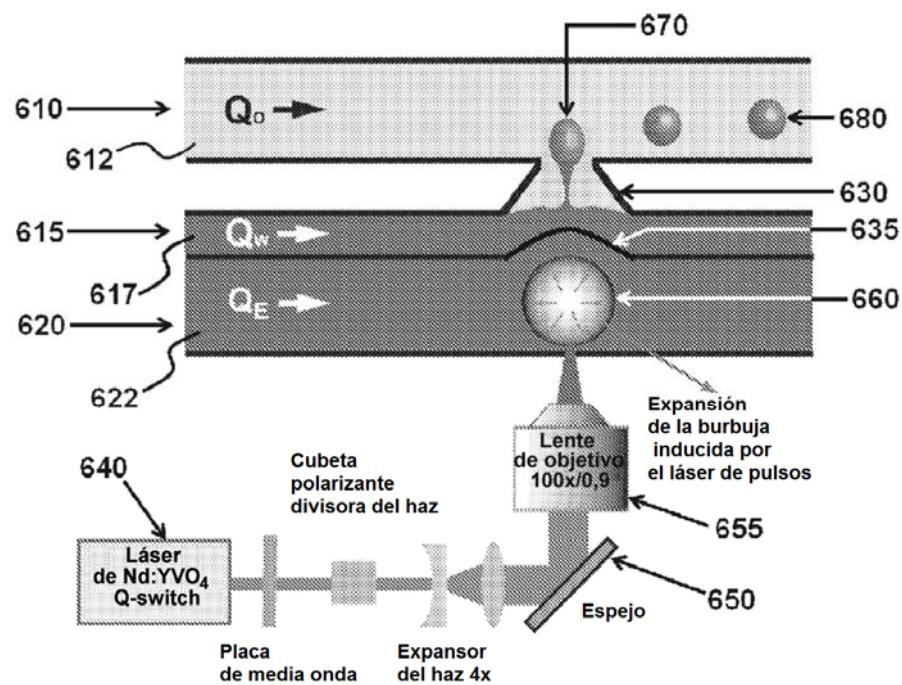


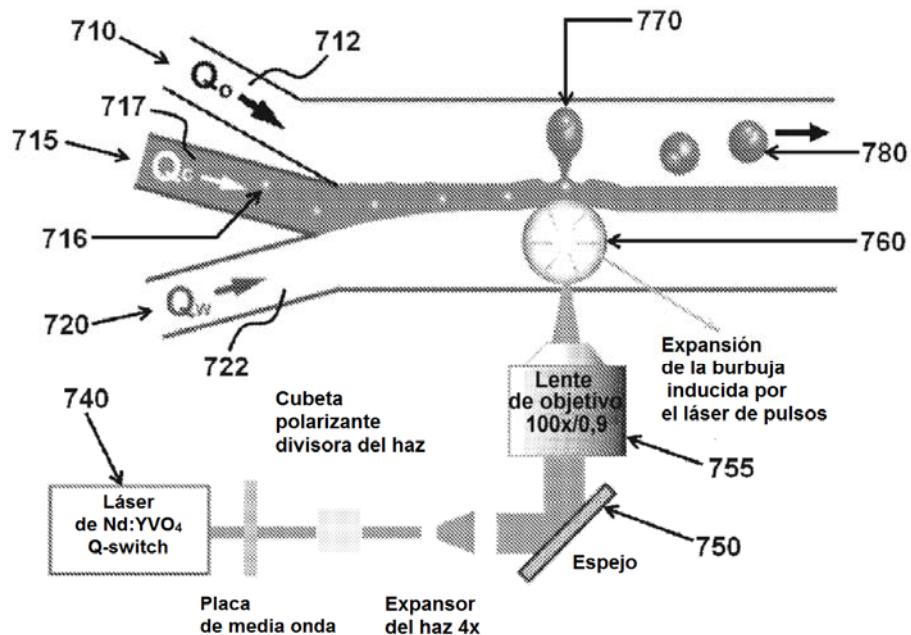
*Fig. 2*

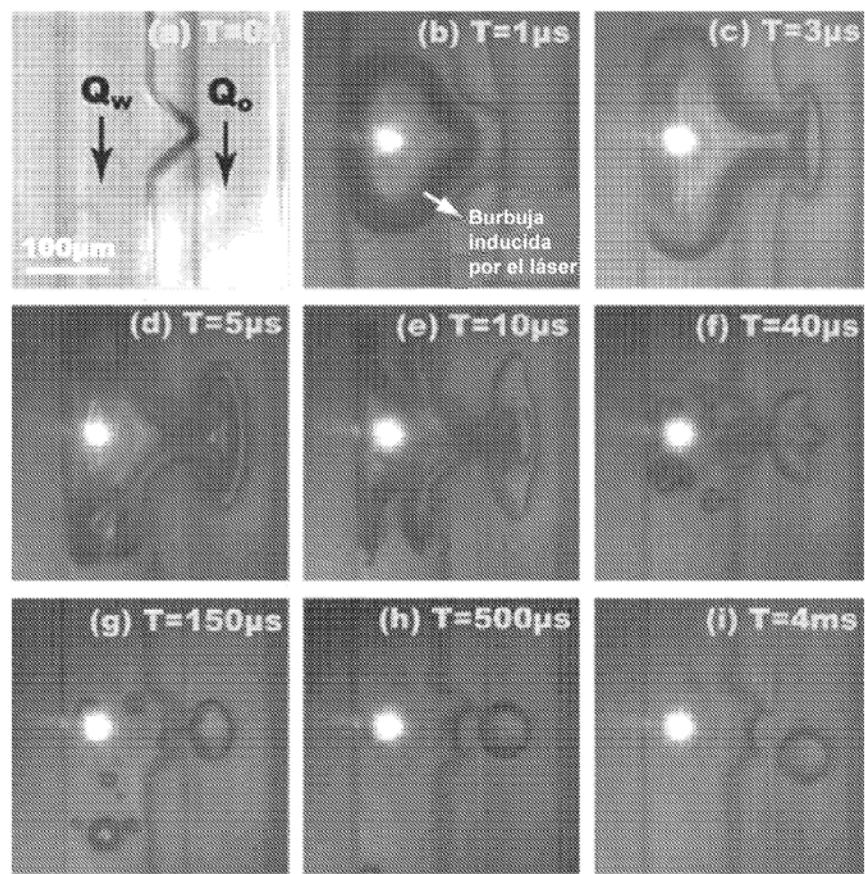
*Fig. 3*

**Fig. 4**

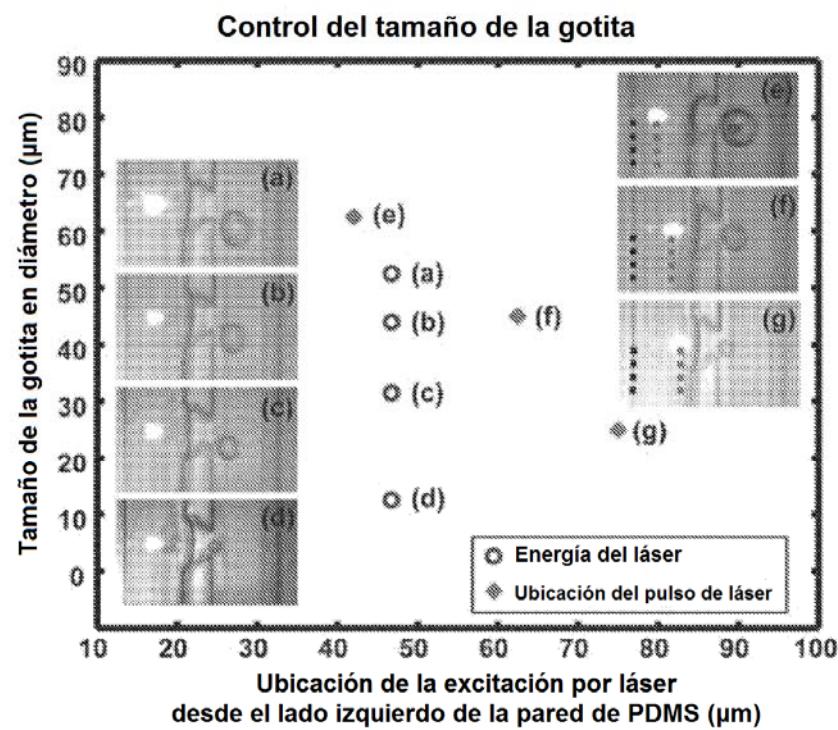
*Fig. 5*

*Fig. 6*

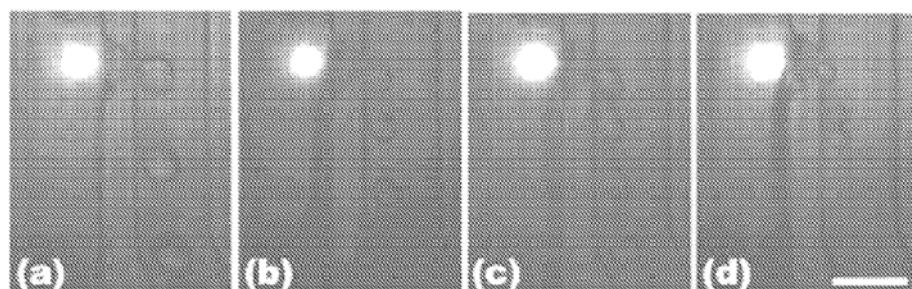
*Fig. 7*



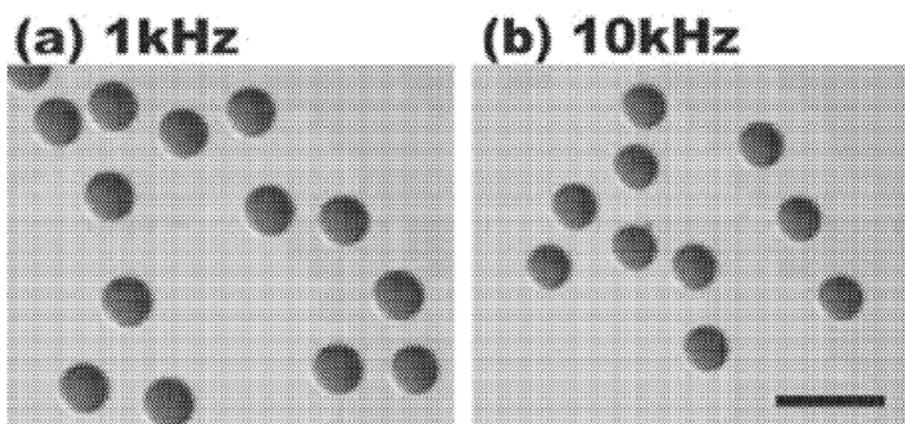
*Fig. 8*



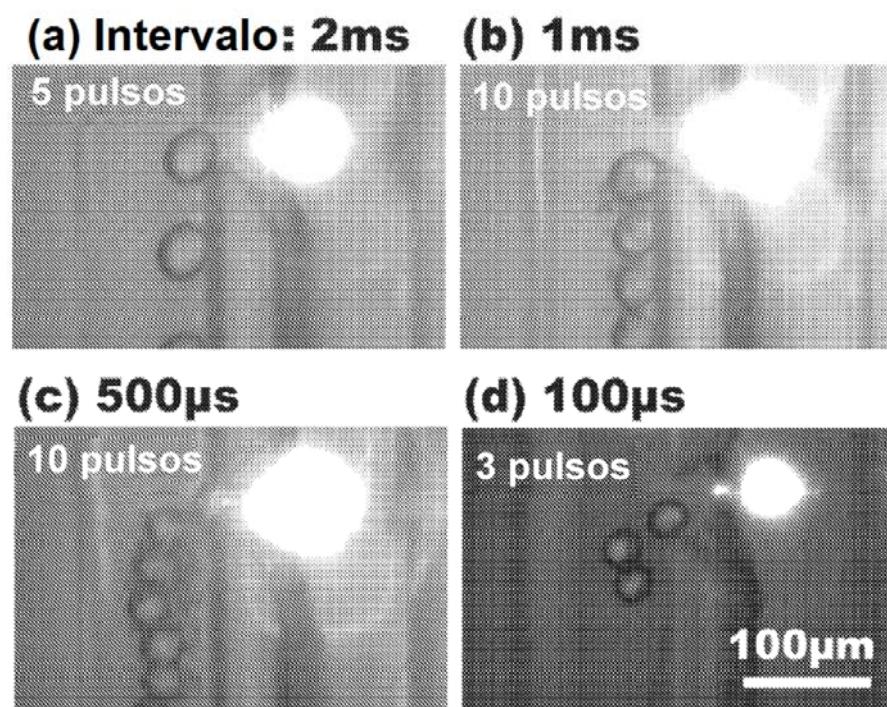
**Fig. 9**



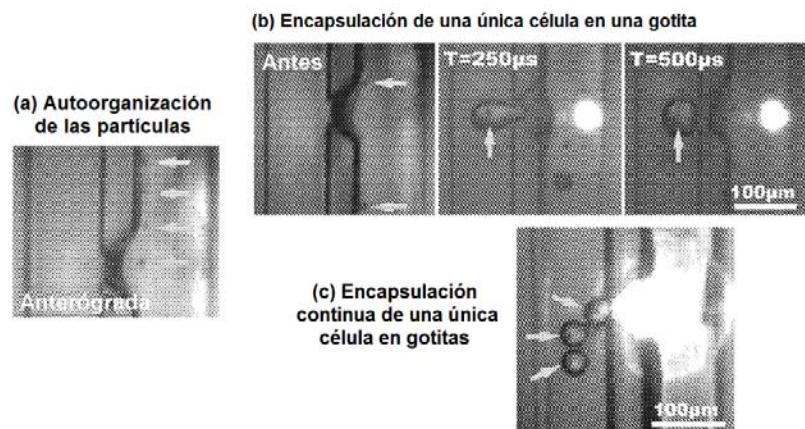
*Fig. 10*



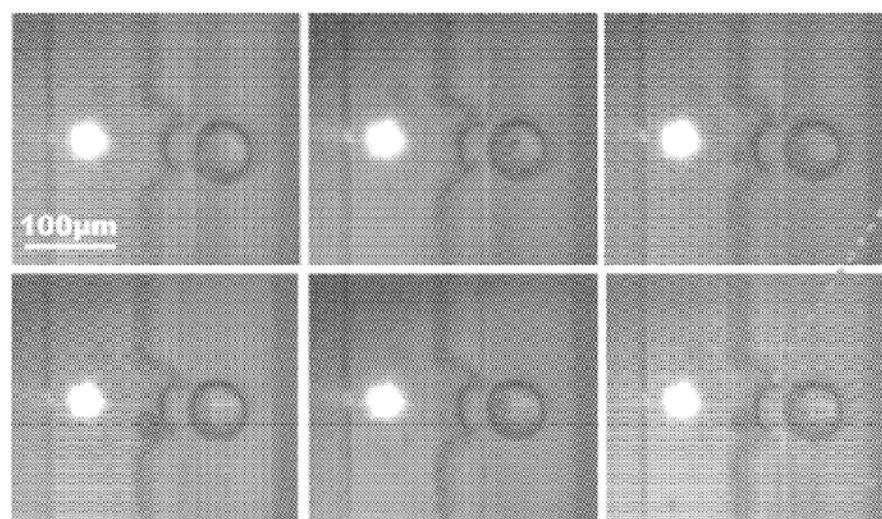
*Fig. 11*



*Fig. 12*



**Fig. 13**



**Fig. 14**