(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 292 239**

(51) Int. Cl.:
B01L 3/00 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **99918230 .6**
(86) Fecha de presentación : **07.05.1999**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1077771**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2001**

(54) Título: **Dispositivo microfluídico.**

(30) Prioridad: **08.05.1998 GB 9809943**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **01.03.2008**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **01.03.2008**

(73) Titular/es: **GYROS PATENT AB.**
Uppsala Science Park
751 83 Uppsala, SE

(72) Inventor/es: **Larsson, Anders;**
Allmer, Klas y
Andersson, Per

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 292 239 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo microfluídico.

La presente invención se refiere a dispositivos microfluídicos que pueden usarse para una variedad de procesos biológicos, por ejemplo detección de supuestas moléculas biológicamente activas frente a cultivos celulares o separación de materiales biológicos, a la preparación de tales dispositivos y a su uso.

Los documentos WO 9721090 (Gamera Biosciences) y WO 9807091 (Gamera Biosciences) describen un sistema microanalítico/microsintético para el análisis biológico y químico que comprende una microplataforma giratoria, por ejemplo un disco, que tiene puertos de entrada, microcanales, cámaras de detección y puertos de salida a través de los que puede fluir líquido. Se incluyen válvulas capilares que se basan en un cambio en las zonas de sección transversal.

El documento WO 9917093 (Univ. Michigan) y Handique *et al* (SPIE Proceedings 3224 (1997) 185-195) proponen el uso de regiones hidrófobas para separar y mover volúmenes de nanolitro precisos en un dispositivo microfluídico sin necesidad de válvulas. Véanse la página 21, líneas 19-22, y la página 186, 2º párrafo, respectivamente. El documento WO9606354 (Biocircuits Corp) propone zonas hidrófobas, barreras físicas, depresiones y capilares control para controlar el flujo de líquido en microplataformas no giratorias.

El documento US 4676274 (Brown) propone una válvula para usarse en un tubo capilar. La función de la válvula está presente en una región definida entre dos barreras capilares y comprende una entrada y una salida para gas. Las barreras capilares se definen como un cambio en la dimensión de sección transversal y/o como una unión entre materiales de tubo hidrófobos e hidrófobos.

El documento WO 9745730 (BIODX) proporciona un sistema microfluídico en el que los microcanales no tienen límites entre las zonas superficiales hidrófilas e hidrófobas que pueden crear resistencia al flujo para dificultar un flujo de líquido. Los microcanales pueden comprender válvulas en forma de tapones desmontables (36 en la figura 11).

El documento WO 9815356 (Molecular Drives Ltd) describe entre otros, un dispositivo circular que comprende un espacio capilar interior con una superficie que porta una serie de pocillos en los que van a producirse las reacciones. Los pocillos pueden ser hidrófilos. El dispositivo gira cuando han de detectarse los resultados en los pocillos individuales.

El documento DE 4400955 (Fraunhofer zur Förderung der angewandten Forschung) describe una superficie de adhesión para la que puede controlarse la capacidad para adherir a entidades por medios eléctricos.

Ahn *et al*. han descrito "un manipulador y separador de partículas magnéticas micromaquinado completamente integrado ("A fully integrated micromachined magnetic particle manipulator and separator"). Véase Proceedings of the Workshop on Micro Electro Mechanical Systems (MEM, OISO, 25-28 de enero, 1994, Nº Workshop 7, 25 enero de 1994, páginas 91-96, XP000528399.

En la actualidad se ha encontrado que pueden prepararse dispositivos microfluídicos en los que puede controlarse el flujo de líquido mediante válvulas que están definidas por límites entre zonas superficiales que tienen características superficiales hidrófilas o hidrófobas diferentes. Por "dispositivos microfluídicos" quiere expresarse dispositivos que pueden manejar microvolúmenes de reactivos, por ejemplo, pueden introducirse en el dispositivo muestras de menos de 1 μl, de manera adecuada menos de 500 nl y preferiblemente entre 1 y 10 nl. Por "líquido" quiere expresarse líquidos como tales y suspensiones de materiales particulados en líquidos.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención es el uso de un límite entre dos zonas superficiales que tienen hidrofilicidades o hidrofobicidades relativas diferentes como una válvula que puede evitar que el flujo de líquido pase la válvula en un dispositivo microfluídico. Véase además la reivindicación 1.

En un segundo aspecto la presente invención es un dispositivo microfluídico tal como se define en la reivindicación 12.

La naturaleza de las características superficiales hidrófilas e hidrófobas, que controlan la función de válvula, depende de la naturaleza del propio líquido. La característica superficial que controla el flujo del líquido es preferiblemente la energía superficial del material, por ejemplo, las superficies de baja energía son normalmente hidrófobas, mientras que las superficies de alta energía son normalmente hidrófilas. La energía de una superficie puede medirse en términos de la tensión superficial crítica (véase por ejemplo Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polimers, Vol 1, Plenum Press, Nueva York, 1985, capítulo 7).

En una realización, el dispositivo microfluídico comprende un sustrato cuya superficie se trata para proporcionar zonas que tienen características superficiales hidrófilas o hidrófobas diferentes, estando dispuestas dichas zonas para permitir el control del flujo de líquidos que pasa a través del sustrato. Por ejemplo, el sustrato puede tener una superficie hidrófoba intercalada con una pluralidad de zonas hidrófilas. Como alternativa, el sustrato puede tener una superficie hidrófila intercalada con una pluralidad de zonas hidrófobas. Preferiblemente, el sustrato se forma a partir de un material plástico tal como policarbonato o un polímero de hidrocarburo (incluyendo un polímero de hidrocarburo halogenado) tal como una poliolefina o material similar, que confiere una superficie hidrófoba al sustrato. Aunque

el sustrato se forma a partir de un material que proporciona una superficie hidrófoba al sustrato, esta superficie hidrófoba puede tratarse, tal como se describe a continuación en el presente documento, para convertirla en una superficie hidrófila. En esta realización, el dispositivo tiene un segundo sustrato aproximadamente paralelo al primero; teniendo el primer sustrato, y opcionalmente el segundo zonas superficiales de características superficiales diferentes que controlan el flujo de líquido dentro del dispositivo.

Si el sustrato comprende una superficie hidrófoba intercalada con zonas hidrófilas, estas zonas hidrófilas comprenden de manera adecuada una pluralidad de series de puntos hidrófilos en la superficie hidrófoba. Por una serie de puntos quiere expresarse varios puntos, de manera adecuada más de 10 y preferiblemente más de 50, por ejemplo 200, que están dispuestos en la superficie dentro de la misma trayectoria de líquido en un patrón predeterminado. La serie puede ser unidimensional, es decir, una línea de puntos, o multidimensional.

Por zonas de diferentes características superficiales quiere expresarse que las zonas de las superficies del sustrato tienen hidrofobicidades o hidrofilicidades relativas diferentes. Los límites entre tales zonas pueden formar en efecto "paredes" que definen la trayectoria del flujo de líquido en el dispositivo. Esta clase de límites forman también "válvulas" que evitan el flujo de líquido a través del límite hasta que se ha suministrado al líquido suficiente energía para permitirle superar la diferencia en las energías superficiales de las superficies.

Se usa un límite entre una superficie hidrófila e hidrófoba para crear una válvula, denominada también en el presente documento como una interrupción. Los parámetros físicos asociados con la válvula, o interrupción, pueden diseñarse para proporcionar presiones de penetración predeterminadas, (es decir, la presión requerida para hacer pasar al líquido más allá del límite). Tales parámetros físicos incluyen las dimensiones de la válvula en términos de su anchura y amplitud en comparación con las dimensiones correspondientes del canal que conduce a ella, la hidrofobicidad de la superficie que forma la válvula y la longitud del canal que conduce a la válvula.

Normalmente, será posible hacer pasar varias veces líquido a través de una válvula de la presente invención. Sin embargo, determinados líquidos, (por ejemplo, suero que contiene un alto contenido en proteína) pueden modificar la superficie hidrófoba haciéndola hidrófila de modo que la válvula funciona sólo una vez. En este caso, cuando se desea añadir más líquido, éste se introducirá mediante un segundo canal, que contiene también una válvula hidrófoba/hidrófila, que conecta con el primer canal.

Se cree que los expertos en la técnica conocen bien los términos hidrófobo e hidrófilo. Que una superficie sea hidrófoba significa que el agua no se extiende sobre ella, sino que permanece en forma de gotas, siendo el ángulo de contacto el medido desde el plano de la superficie, tangente a la superficie de agua en la línea del límite de tres fases. Por tanto, las superficies hidrófobas se han caracterizado por tener ángulos de contacto elevados con agua, con frecuencia en el intervalo de 40 a 110 grados (Zettlemeyer, Hydrophobic Surfaces, Ed. F.M. Fowkes, Academic Press, (Nueva York). Las superficies hidrófilas son aquellas que tienen ángulos de contacto bajos con agua, con frecuencia en el intervalo de 1 a 25 grados. Sin embargo, sin limitación y sólo para el fin de orientación, las superficies hidrófobas adecuadas incluyen polímeros de hidrocarburo, incluyendo polímeros de hidrocarburo halogenado, véase por ejemplo la tabla 1, mientras que las superficies hidrófilas adecuadas incluyen óxidos de metal no contaminado, materiales siliciosos, tales como vidrio y polisacáridos. Las superficies de los materiales pueden modificarse para cambiar sus propiedades, es decir, pueden proporcionarse propiedades hidrófobas a los materiales hidrófilos mediante tratamiento superficial con un material hidrófobo tal como una especie que contiene hidrocarburo, hidrocarburo perfluorado o silicona. Asimismo, los materiales hidrófobos pueden hacerse hidrófilos mediante la introducción de grupos cargados o grupos hidroxilo, amida o poliéter en la superficie. Con frecuencia es conveniente transformar la totalidad (o sustancialmente la totalidad) de una superficie hidrófoba en una superficie hidrófila y entonces introducir zonas de hidrofobicidad en la superficie hidrófila. Puede ser suficiente una pequeña fracción de una capa monomolecular para cambiar drásticamente las características superficiales. Cuando los límites hidrófobo/hidrófilo forman "paredes" y "válvulas", entonces la diferencia de energía superficial para formar una pared puede ser igual o distinta a aquella para una válvula, sin embargo, la diferencia de energía para una pared será normalmente más alta que aquella para una válvula.

Algunas o todas las zonas intercaladas en la superficie (ya sean hidrófobas o hidrófilas) pueden tratarse de manera adecuada para permitir el cultivo de células sobre ellas. En esta realización, puede usarse el dispositivo por ejemplo para detectar acontecimientos intracelulares (véase por ejemplo la patente europea 650396 sobre cómo puede realizarse esto).

Los líquidos adecuados para su uso en los dispositivos de la presente invención son aquellos que tienen una tensión superficial preferiblemente mayor de 18 mNm^{-1}. Se prefieren suspensiones o disoluciones acuosas que tienen una tensión superficial mayor de 50 mNm^{-1}.

Los materiales particulados adecuados para su uso en los dispositivos de la presente invención son polvos o perlas que tienen un tamaño de partícula inferior a 200 μm. Estos materiales particulados están presentes en un vehículo líquido.

El dispositivo microfluídico es circular y está adaptado para la rotación alrededor de su eje. Tal adaptación puede tomar forma de un orificio en el eje de uno o ambos sustratos, que puede acoplarse a su árbol de accionamiento. Otros procedimientos para rotar el dispositivo incluyen fijar el dispositivo y poner en contacto el perímetro con una superficie móvil, por ejemplo ruedas móviles, o colocar el dispositivo sobre un plato giratorio y girar el plato giratorio.

La entrada de líquido es normalmente hacia el eje del dispositivo. La entrada puede ser un único puerto unido a un canal de alimentación anular dentro del dispositivo o puede ser una serie de puertos dispuestos a intervalos angulares espaciados alrededor del eje. Normalmente, está ubicada una salida anular hacia la circunferencia del dispositivo. El líquido puede fluir de una manera laminar en canales formados mediante límites hidrófobos/hidrófilos o bien mediante paredes interiores que conectan los dos sustratos. Estas paredes interiores están dispuestas convenientemente de manera radial alrededor del eje del dispositivo. Los canales son normalmente de dimensiones adecuadas para permitir que las fuerzas capilares actúen sobre el líquido dentro del canal.

Cuando se adapta el dispositivo para cultivo celular es preferible tener una fuente de gases disponible, que ayude al crecimiento celular. En este caso, habrá una o más entradas de gas en el dispositivo, que están situadas convenientemente en proximidad cercana a las células que van a cultivarse. Las trayectorias de gas se proporcionan conectando las entradas de gas a las células o las trayectorias de líquido conectadas a las células, permitiendo suministrar medio de cultivo/nutrientes y gas, por ejemplo aire, por las trayectorias de líquido.

Los sustratos que forman el dispositivo son convenientemente paralelos y preferiblemente están juntos lo suficientemente cerca para permitir que los líquidos en el dispositivo se sometan a fuerzas capilares, de manera adecuada separados menos de dos milímetros, preferiblemente menos de un milímetro. Por tanto, puede alimentarse un líquido en la entrada de líquido y entonces se succionará por las trayectorias de líquido mediante acción capilar hasta que alcance una válvula, convenientemente un límite hidrófobo/hidrófilo, después del que no puede fluir hasta que se aplique más energía. Esta energía se proporciona mediante la fuerza centrífuga creada rotando el dispositivo. Una vez que la fuerza centrífuga es suficiente, el líquido fluirá a través de la válvula y continuará en una dirección hacia fuera hasta que alcance la salida de líquido anular. Si las zonas intercaladas en la superficie son hidrófilas, el líquido tendrá una tensión superficial mayor de 50 mNm^{-1}, por ejemplo suspensiones o disoluciones acuosas, y si son hidrófobas el líquido será hidrófobo, por ejemplo disolventes orgánicos no polares. Por tanto, se atraerá el líquido a las zonas/puntos sobre la superficie.

En la realización en la que se forman las trayectorias entre sustratos paralelos, las superficies que forman las trayectorias de líquido pueden tener por sí mismas zonas de hidrofobicidad y hidrofilicidad alternas formando series de puntos. Estas zonas alternas de hidrofobicidad/hidrofilicidad pueden formase sobre la superficie de uno o ambos sustratos, por ejemplo, una superficie puede tener zonas alternas mientras que la superficie opuesta no las tiene.

Como alternativa, las trayectorias de líquido pueden contener una sustancia para separar materiales químicos/biológicos, por ejemplo puede retenerse un gel para cromatografía o electroforesis o perlas en las trayectorias para llevar a cabo ensayos; por ejemplo, ensayos de proximidad de centelleo o pueden retenerse células en las trayectorias a través del reconocimiento de superficie específica.

Pueden formarse zonas de hidrofobicidad/hidrofilicidad sobre una superficie mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo.

1. *Enmascaramiento y tratamiento con plasma*

Esto es aplicable a la mayoría de las superficies y permite conseguir con facilidad diferentes grados de hidrofilicidad/hidrofobicidad. Se une una máscara (cinta adhesiva o película fundida) de modo que se ajusta herméticamente a todas las características superficiales. Se lleva a cabo entonces el tratamiento con plasma sobre la superficie no enmascarada.

2. *"Fotoresistente" hidrófilo*

Se recubre la superficie de plástico con una capa muy fina de polímero hidrófilo (por ejemplo un poli(cinamato de vinilo)) que se reticula mediante iluminación a través de una máscara. Se elimina mediante lavado el polímero no reticulado.

3. *Polímero tensioactivo reticulable*

Se adsorbe un polímero reactivo, tensioactivo desde la disolución acuosa hasta las superficies de plástico y se ilumina a través de una máscara. Se elimina mediante lavado el polímero no reticulado.

4. *Tensioactivos polimerizables*

Se adsorbe una monocapa de tensioactivo polimerizable (por ejemplo, los fosfolípidos funcionales de diacetileno de Biocompatibles Ltd) y se ilumina a través de una máscara. Se elimina mediante lavado el tensioactivo no reticulado.

5. *Fotooxidación*

Se iluminan las superficies de plástico con una fuente de luz potente (por ejemplo, lámpara de Hg o láser UV) a través de una máscara de modo que se oxidan las zonas iluminadas mediante oxígeno atmosférico.

6. *Tratamiento con haz de electrones*

Se irradia el plástico a través de una máscara de modo que las zonas irradiadas están en contacto con el aire (u otro medio reactivo) y se oxidan creando grupos hidrófilos.

Con el fin de que pueda entenderse mejor la invención, se describirán ahora varias realizaciones de la misma, sólo a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 es un diagrama de una superficie tratada según la invención;

la figura 2 es un diagrama similar a la figura 1, que muestra una disposición diferente;

la figura 3 es un diagrama de dispositivo microfluídico de doble sustrato según la invención;

la figura 4 es un diagrama para ilustrar el uso de zonas hidrófilas para cultivar células;

la figura 5 es una vista en planta parcial de un dispositivo microfluídico de disco giratorio según la invención;

la figura 6 es una vista de parte de la figura 5, ilustrada en mayor detalle; y

la figura 7 es una vista desde arriba de un segmento de un disco microfluídico y sus microcanales/trayectorias de flujo.

Refiriéndose en primer lugar a la figura 1, se muestra una máscara con una serie de 6x6 puntos 1 hidrófilos, cada uno de 3x3 mm sobre una superficie 2 hidrófoba de 50x50 mm, que se fabricó en Mac DrawPro™ y se imprimió en una impresora láser. Se copió la copia impresa sobre una hoja para transparencia en una fotocopiadora.

El volumen de una película de 25 mm de espesor sobre una superficie 2 de 50x50 mm es de 62,5 ml. Se depositó este volumen de poliacrilamida (PAA) sobre la cara hidrófoba de una película Gelbond™ y se colocó la máscara anterior sobre la parte superior de la gota. Se mojó la zona por debajo de la máscara mediante fuerzas capilares (una pequeña parte de la disolución acabó fuera de la máscara). Se llevó a cabo la fotopolimerización a través de la máscara durante un tiempo de exposición de 3 minutos. Se retiró la máscara y se aclaró la superficie con agua. Era visible un patrón claro debido al mojado selectivo en la superficie de PAA.

La figura 2 ilustra una serie unidimensional de puntos 1 hidrófilos sobre una superficie 4 hidrófoba. Tal como se explicará, con una fuerza adecuada aplicada, puede provocarse que un líquido pase de punto a punto de modo que la estructura forma un canal definido para el flujo de líquido.

La figura 3 ilustra una disposición que comprende placas 5,6 superiores e inferiores en forma de discos giratorios, que tienen un eje de rotación común. Los discos se ilustran muy separados para el fin de claridad; en la práctica, los discos estarán separados por una distancia definida por las paredes 7 de soporte anulares, cuya distancia será adecuada para el movimiento del líquido entre las placas mediante la acción capilar.

El disco 5 superior está provisto de orificios 8 de entrada para suministrar líquidos al interior. Alineadas con éstos están las zonas 9 correspondientes sobre la superficie superior del disco 6 inferior, que son hidrófilas. Pasando en una dirección axial entre las zonas 9, está una zona 10 alargada, que también es hidrófila. Las partes restantes de superficie superior del disco 6 son hidrófobas. La zona alargada forma eficazmente un canal para líquido entre las zonas 9. La superficie hidrófila de la zona 10, unida en ambas caras por la superficie superior hidrófoba del disco 6 garantiza que la trayectoria de líquido se defina claramente por las “paredes” que están formadas por la superficie de contacto entre las zonas hidrófobas e hidrófilas.

Si se giran los discos juntos alrededor del eje común, se observará que la fuerza centrífuga empujará el líquido a lo largo del canal formado por la zona 10 desde la zona 9 más interna hasta la zona 9 más externa.

La figura 4 ilustra cómo pueden aplicarse las células a una zona 2 hidrófila. Se proporciona una entrada 23 para la introducción de células y reactivo y se proporciona un canal 24 hidrófobo para la respiración de las células durante su crecimiento en la zona 2 y para el aclarado entre las pruebas.

Ahora se hace referencia a las figuras 5 y 6 que muestran un dispositivo microfluídico en forma de un disco 10 compacto (CD) sobre el que se forman zonas hidrófobas e hidrófilas para permitir que los líquidos se dirijan alrededor de la superficie del disco para permitir la realización automática y simultánea de múltiples pruebas químicas/biológicas en múltiples muestras.

La figura 5 muestra una sección de un disco 10 compacto que tiene un borde 11 perimetral y un orificio 12 central alrededor del que puede montarse para la rotación dentro de un lector de disco compacto (no mostrado). En la superficie del disco compacto se forman 40 series 16 multidimensionales con forma de sector de puntos hidrófilos. Tal como se aclara en la vista A a escala ampliada en la figura 6, los puntos se disponen en canales 13 rectos individuales irradiando radialmente desde el centro del disco. Cada canal comprende zonas o interrupciones hidrófobas alternas 14 y zonas hidrófilas o puntos 15. Las interrupciones hidrófobas 14 son normalmente de 75 μm de ancho en la dirección radial. Los puntos 15 hidrófilos son normalmente de 108 μm de ancho en la dirección radial.

En la realización ilustrada, hay 20 canales en cada serie 16 y hay 200 puntos 15 hidrófilos en cada canal. Por tanto, cada serie 16 contiene 4000 puntos hidrófilos.

Los canales en cada serie 16 comienzan en una zona 17 hidrófila común y terminan en una zona 18 hidrófoba común, constituyendo una interrupción. Posicionado radialmente hacia el exterior de la zona 18 hidrófoba, está un canal 19 de desecho común.

Se introduce el reactivo líquido para su uso en la realización de las pruebas en un canal 20 anular interno, que es común a todas las series 16. Extendiéndose desde el canal 20 hay 40 interrupciones 21 hidrófobas que se extienden radialmente, extendiéndose cada una hasta la zona 17 hidrófila de una serie 16 respectiva. Se introduce una muestra que va a someterse a prueba en la zona 16 hidrófila en 22. De este modo pueden someterse a prueba 40 muestras diferentes simultáneamente.

Las pruebas de la muestra se llevan a cabo aplicando a cada una de las zonas 14 hidrófilas una muestra de un reactivo conocido, por ejemplo un oligonucleótido conocido. Se observará que el dispositivo tiene potencial para someter a prueba cada muestra frente a 4000 reactivos diferentes. Puede formase una tapa sobre cada punto hidrófilo mediante evaporación y se producirá con la vaporización una concentración previa precisa.

A continuación se rellena el canal 20 de reactivo, y se gira el disco para provocar que el reactivo se impulse a través de la "válvula" producida mediante la interrupción 21 hidrófoba y radialmente hacia fuera hasta el canal 19 de desecho. El progreso a lo largo de los canales 13 individuales es mediante una serie de impulsos a través de las "válvulas" eficaces producidas por las interrupciones 14 hidrófilas. La fuerza requerida para superar las interrupciones se proporciona mediante la acción centrífuga del disco rotativo.

Una vez que el reactivo está manando en el canal 19 de desecho, se para el disco y se añade la muestra de líquido en 22. Normalmente, el volumen de muestra es de 0,1 μl. Ahora se gira el disco a 2 velocidades alternas (para el mezclado de hibridación) con lo cual la fuerza centrífuga moverá el tapón del líquido a lo largo de los canales 13, y la acción capilar subirá de nuevo el líquido. Normalmente, el volumen de muestra requerido para cada punto 15 es de 44 pl.

Se lleva a cabo la lectura de los resultados de la prueba examinando los puntos 15 individuales usando un lector adecuado. Después de que se haya completado la prueba, puede aclararse el disco mediante la aplicación de un líquido de aclarado adecuado en el canal 20 y girando el disco para mover el líquido de aclarado hacia fuera a lo largo de los canales 13 mediante la fuerza centrífuga.

La figura 7 muestra una sección de un CD 23 que tiene dos canales 24 y 25 hidrófilos anulares internos consecutivos, que están conectados mediante un canal 26 hidrófilo radial y un canal 27 que contiene una zona o interrupción A hidrófoba. El canal 25 anular más externo está conectado a un canal 28 de desecho anular mediante un canal 29 de desagüe hidrófilo radial que tiene una interrupción o válvula Y2 hidrófoba adyacente a la unión con el canal 28 de desecho. El canal 25 anular está conectado también a dos cámaras 30 y 31 dispuestas en serie, estando la segunda conectada a su vez al canal 28 de desecho. Los canales 25 y 28 anulares y las cámaras 30 y 31 están conectados por medio de canales que contienen interrupciones o válvulas B, C y D hidrófobas.

La cámara 30 más interna tiene una superficie tratada que permite el crecimiento de células dentro de la cámara. Está provista también de un canal 32 de aire, que contiene una interrupción hidrófoba, y que, como alternativa, puede actuar como un puerto de entrada de muestra. La cámara 31 más externa tiene una superficie hidrófila no tratada, y puede actuar convenientemente como una zona de análisis junto con un detector (no mostrado).

Se introduce el reactivo acuoso para su uso en la realización de pruebas en un canal 25 anular y se alimenta mediante acción capilar a los canales radiales hasta que alcanza las interrupciones o válvulas B y Y2 hidrófobas. Entonces se gira el CD a una primera velocidad de rotación de modo que el líquido pasa a través de Y2 al canal 28 de desecho y luego a través de B hasta que alcanza C. Se dejan crecer las células en la cámara 30 y cuando el cultivo celular ha alcanzado el nivel requerido, se gira el disco de nuevo a una segunda velocidad de rotación más alta, de modo que se transfiere el contenido de la cámara 30 a la cámara 31, pero se evita que se desplace más mediante las interrupciones o válvulas D hidrófobas. Puede entonces llevarse a cabo un análisis, u otra manipulación, en la cámara 31 tras lo que se gira el CD a una tercera velocidad de rotación todavía más alta, de modo que el contenido de la cámara 31 pasa a través de D al canal 28 de desecho.

Entonces puede introducirse una disolución de aclarado en el canal 24 anular. Se gira de nuevo el CD de modo que la disolución pasa a través de las interrupciones o válvulas Y y A hidrófilas, a las cámaras 30 y 31 y luego al canal de desecho.

Con el fin de evitar el "deslizamiento" capilar de los líquidos alrededor de las esquinas hidrófilas, se aplicó una superficie hidrófoba a una cara de los canales capilares, designados V en la figura 8. (Los canales son normalmente de sección transversal cuadrada o rectangular. La hidrofobicidad y dimensiones de las interrupciones o válvulas Y, Y2, A, B, C y D se seleccionan de modo que la fuerza requerida para hacer que el líquido fluya por D es mayor que en C que a su vez es mayor que en B que es mayor que en Y2).

Los siguientes ejemplos ilustran la preparación de superficies que tienen características diferentes en un sustrato hidrófobo.

Ejemplo 1

Se enmascaró selectivamente un disco CD hecho de Zeonex™ (un copolímero de cicloolefina fabricado por Nippon Zeon, Japón), que tenía canales microfabricados empotrados en la superficie, aplicando un líquido formador de película viscoso en los puntos deseados de los canales. Como líquido formador de película se usó OwocoRod™ (a base de un polímero soluble en agua sintético) o bien Owoco Rosa™ (a base de una dispersión de látex de caucho sintético), ambos suministrados por Owoco AB, Estocolmo, Suecia. Tras secar, se colocó el disco en un reactor de plasma (Plasma Science™ PS0500 de BOC Coating Technology, Concord, Ca, EE.UU.) y se trató con un plasma de oxígeno (flujo de gas de 5 cm^3/min, potencia de RF de 500 W) durante 10 min. Entonces se retiró la máscara mediante aclarado con agua seguido de un aclarado con etanol. Las zonas no enmascaradas tenían un ángulo de contacto con el agua de 5 grados, mientras que las zonas enmascaradas tenían un ángulo de contacto de 90 grados. Se colocó sobre el disco una cubierta de caucho de silicona blanda y se introdujo una disolución de colorante acuosa en los canales. La disolución penetró mediante autosucción en las zonas de canal no enmascaradas, pero paró en las zonas enmascaradas hidrófobas. Girando el disco a 3000 rpm, pudo hacerse pasar la disolución por las zonas enmascaradas.

Ejemplo 2

Se colocó un disco CD hecho de policarbonato, que tenía canales microfabricados empotrados en la superficie, en un reactor de plasma (Plasma Science™ PS0500 de BOC Coating Technology, Concord, Ca, EE.UU.) y se trató con un plasma de oxígeno (flujo de gas de 5 cm^3/min, potencia de RF de 500 W) durante 10 min. Tras el tratamiento, la superficie del disco tenía un ángulo de contacto con el agua de 5 grados. Entonces se aplicó una disolución al 0,5% de poliisobutileno en ciclohexano localmente en puntos seleccionados y se dejó secar. Las zonas revestidas con poliisobutileno tenían un ángulo de contacto con el agua de 100 grados. Entonces se colocó una cubierta de caucho de silicona blanda sobre el disco y se introdujo una disolución de colorante acuosa en los canales. La disolución penetró mediante autosucción en las zonas de canal no revestidas, pero paró en las zonas revestidas hidrófobas. Girando el disco a 3000 rpm, pudo hacerse pasar la disolución también por las zonas revestidas.

Ejemplo 3

Se modeló con oro un disco CD hecho de policarbonato, que tenía canales microfabricados empotrados en la superficie, mediante evaporación a través de una máscara de sombra. En primer lugar se evaporó a través de la máscara una capa de cromo de 40 nm de espesor. Luego se colocó el disco CD en un reactor de plasma (Plasma Science™ PS0500 de BOC Coating Technology, Concord, Ca, EE.UU.) y se trató con un plasma de aire (flujo de gas de 10 cm^3/min, potencia de RF de 500 W) durante 10 min. Tras el tratamiento, la superficie del disco tenía un ángulo de contacto con el agua de 6 grados. Entonces se colocó el disco CD en un recipiente de vidrio y se añadieron 50 ml de una disolución 1 mM de octadecil mercaptano en etanol. Tras una hora en la disolución de mercaptano, se aclaró con cuidado el disco CD con etanol. El ángulo de contacto con el agua en la zona del policarbonato era de 7 grados, y de 79 grados en la superficie de oro. Entonces se colocó una cubierta de caucho de silicona blanda sobre el disco y se introdujo una disolución de colorante acuosa en los canales. La disolución penetró mediante autosucción en las zonas de canal no revestidas, pero paró en las zonas revestidas con oro hidrófobas. Girando el disco a 3200 rpm, pudo hacerse pasar la disolución también por las zonas revestidas.

TABLA 1

Superficie	**Ángulo de contacto con el agua (grados)**
Politetrafluoroetileno (Teflon)*	108
Polietileno*	94
Polipropileno*	95
Poli(metacrilato de metilo)*	80
Platino*	40
Vidrio**	"pequeño"
Oro*	65,5
* A.C. Zettlemeyer (Hydrophobic surfaces, Ed P M Fowkes, Academic Press (Nueva York) 1969, páginas 1 -27 ** A.W. Adamson Physical chemistry of surfaces 5ª ed, Wiley-Interscience 1990, 9 397.	

REIVINDICACIONES

1. Un uso de un límite entre dos zonas superficiales que tienen hidrofilicidades o hidrofobicidades relativas diferentes como una válvula en un dispositivo microfluídico que comprende trayectorias predeterminadas para el flujo de líquido, en el que

a) las superficies de las trayectorias son hidrófilas y la válvula está formada por una sección hidrófoba en una trayectoria de este tipo, y

b) se evita el flujo de líquido a través del límite a menos que se le haya administrado al líquido suficiente energía para permitirle superar las diferencias en energía superficial de las zonas superficiales rotando el dispositivo.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que el dispositivo microfluídico se **caracteriza** por poder manejar volúmenes de muestras de reactivo que son inferiores a 1 μl.

3. El uso según la reivindicación 1, en el que el dispositivo microfluídico se **caracteriza** por poder manejar volúmenes de muestras de reactivo que son inferiores a 500 nl.

4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el dispositivo microfluídico se **caracteriza** por comprender dos sustratos paralelos y por estar dichas trayectorias entre dichos sustratos.

5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el dispositivo se **caracteriza** porque es circular y está adaptado para la rotación alrededor del eje del dispositivo.

6. El uso según la reivindicación 5, en el que el dispositivo se **caracteriza** porque tiene una entrada para el líquido hacia el centro del dispositivo y una salida anular para el líquido hacia la circunferencia del dispositivo.

7. El uso según la reivindicación 5, en el que el dispositivo se **caracteriza** porque tiene una entrada que comprende una serie de puertos de entrada dispuestos a intervalos espaciados alrededor del eje.

8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que las trayectorias tienen dimensiones que permiten que la fuerza capilar actúe sobre el líquido dentro de las trayectorias.

9. El uso según la reivindicación 8, en el que se succiona un líquido por una trayectoria de líquido hasta la válvula mediante acción capilar, con lo que se aplica energía al líquido mediante dicha rotación con el fin de que el líquido pase la válvula.

10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el líquido tiene una tensión superficial $> 18\ mNm^{-1}$.

11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el líquido es una suspensión o disolución acuosa que tiene una tensión superficial $> 50\ mNm^{-1}$.

12. Un dispositivo microfluídico **caracterizado** porque comprende a) un disco circular que está adaptado para la rotación alrededor de su eje y comprende dos sustratos entre los que hay trayectorias hidrófilas predeterminadas para el flujo de líquido, y b) una válvula que está presente en una trayectoria de este tipo y se define como el límite entre zonas superficiales de hidrofilicidades o hidrofobicidades relativas diferentes en uno de los sustratos en una sección hidrófoba en una trayectoria de este tipo, en el que se evita el flujo de líquido a través de dicho límite a menos que se le haya administrado al líquido energía suficiente para permitirle superar las diferencias en energía superficial entre las zonas superficiales rotando el dispositivo alrededor de dicho eje.

13. El dispositivo microfluídico según la reivindicación 12, **caracterizado** porque está adaptado para manejar volúmenes de muestras de reactivo que son inferiores a 1 μl.

14. El dispositivo microfluídico según la reivindicación 12, **caracterizado** porque está adaptado para manejar volúmenes de muestras de reactivos que son inferiores a 500 nl.

15. El dispositivo microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, **caracterizado** porque las paredes interiores que conectan los dos sustratos definen las trayectorias.

16. El dispositivo microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, **caracterizado** porque comprende una entrada hacia el eje del dispositivo.

17. El dispositivo microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 12-16, **caracterizado** porque comprende una serie de puertos de entrada a intervalos espaciados alrededor del eje.

18. El dispositivo microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 12-17, **caracterizado** porque comprende una entrada para líquido hacia el centro y una salida anular para líquidos hacia la circunferencia del dispositivo.

19. El dispositivo microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 12-18, **caracterizado** porque las trayectorias tienen dimensiones que permiten que las fuerzas capilares actúen sobre el líquido dentro de los canales.

Fig.1.

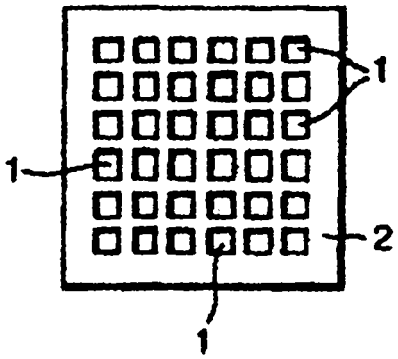


Fig.2.

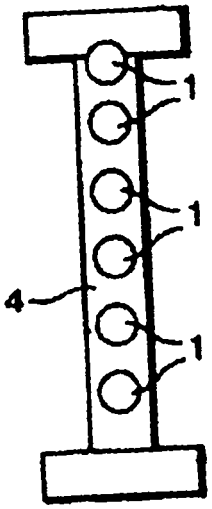


Fig.3.

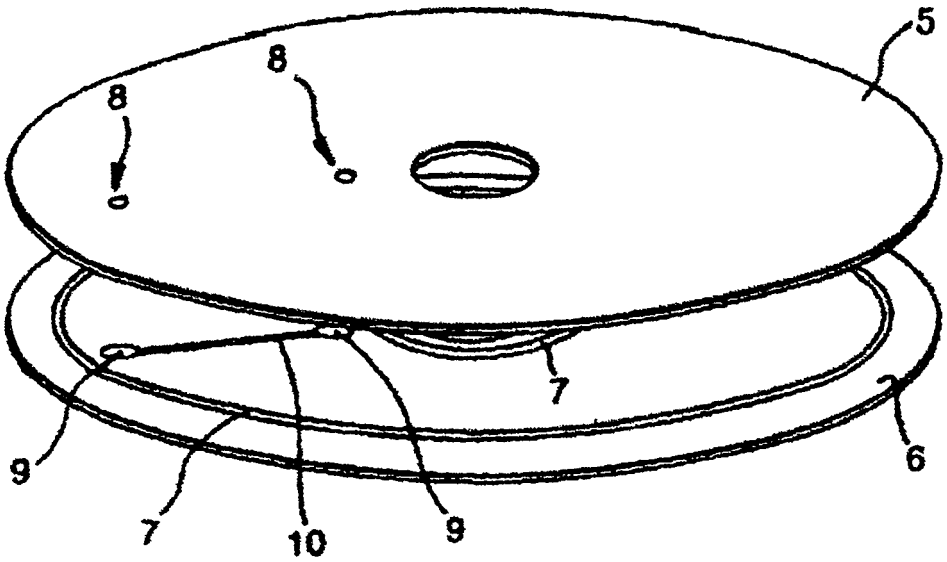


Fig.4.

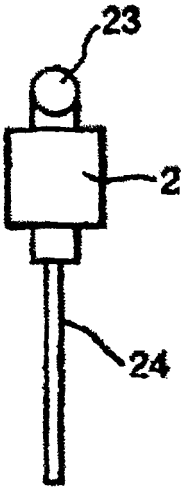
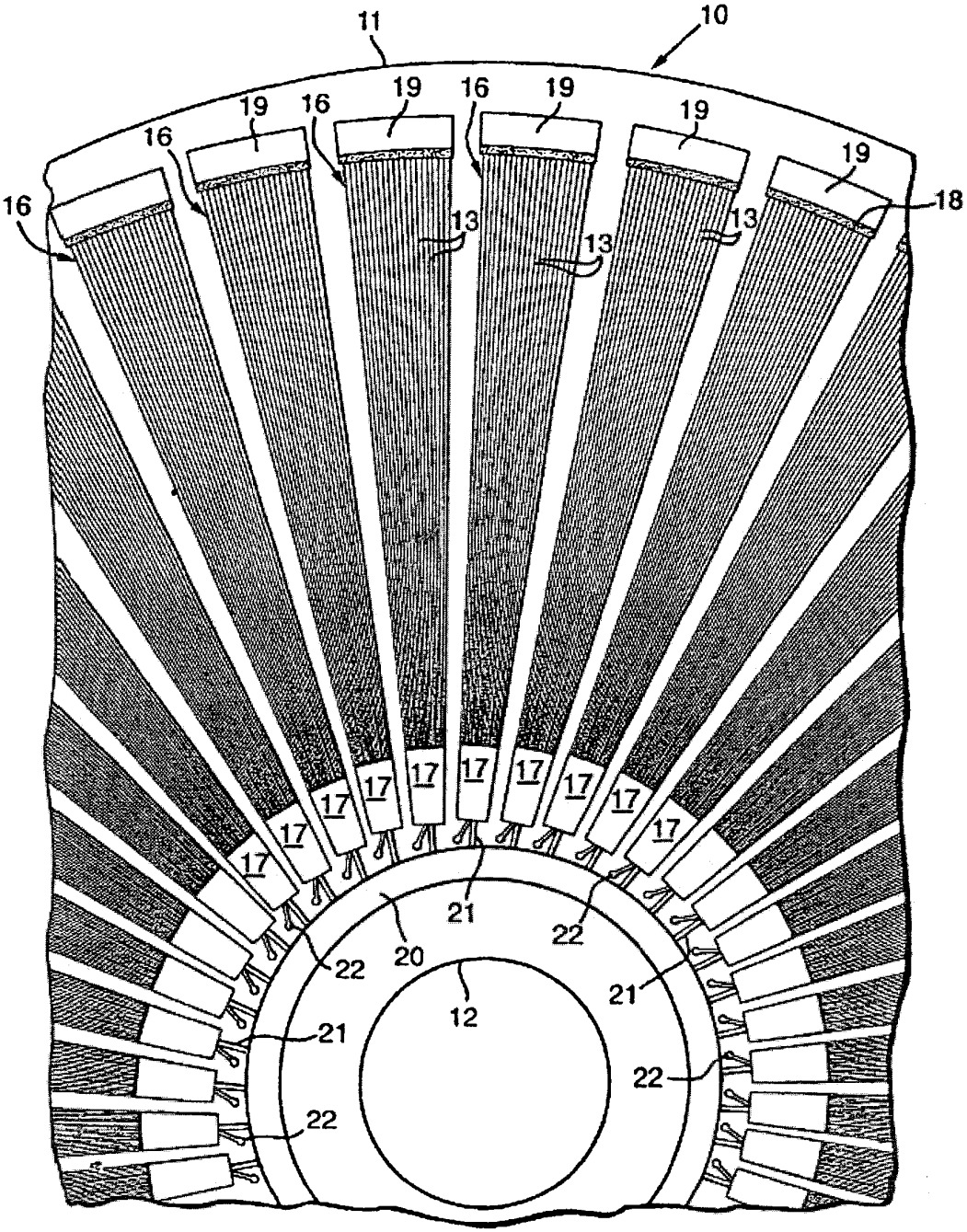


Fig.5.


11
10
19
16
19
16
19
16
19
19
18
16
13
13
13
17
17
17
17
17
17
17
17
17
21
22
20
22
21
12
21
22
22

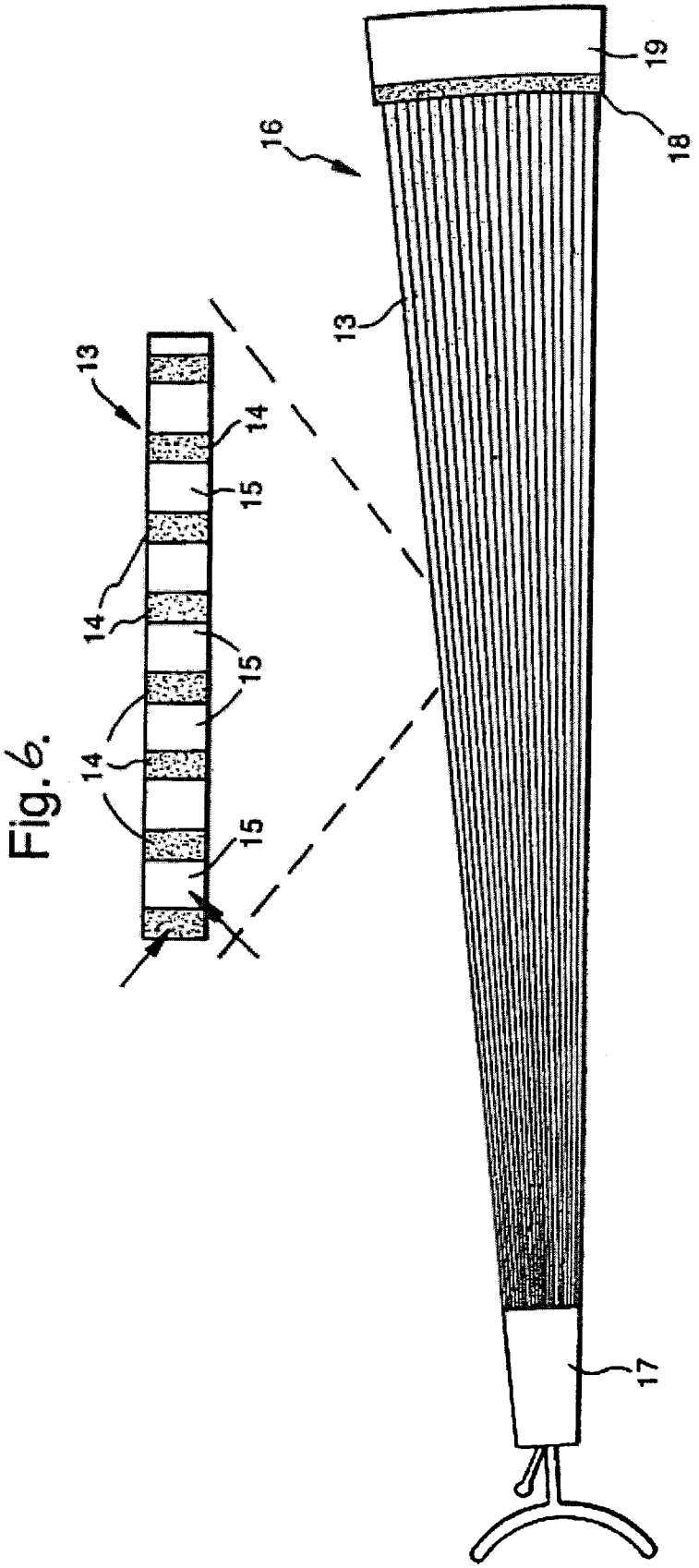


Fig. 6.

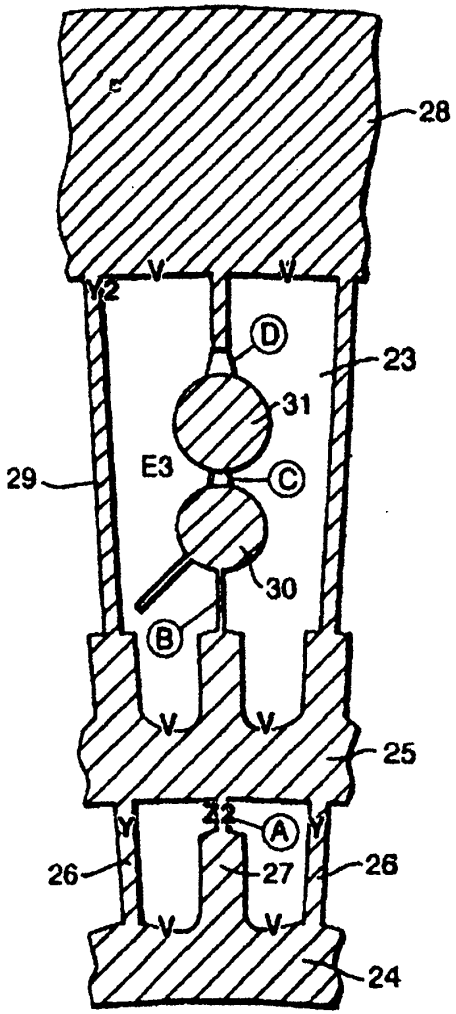


Fig.7.

Anchura de los canales A-D

Canal	A (μm)	B (μm)	C (μm)	D (μm)
	150	50	33	17