



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0806831-3 B1



(22) Data do Depósito: 11/02/2008

(45) Data de Concessão: 25/06/2019

(54) Título: MÉTODOS ATUADORES DE GOTÍCULAS EMPREGANDO ESFERAS MAGNÉTICAS

(51) Int.Cl.: G01N 33/543; B01L 3/00.

(30) Prioridade Unionista: 04/09/2007 US 60/969,736; 09/02/2007 US 60/900,653; 17/10/2007 US 60/980,762; 17/10/2007 US 60/980,772.

(73) Titular(es): ADVANCED LIQUID LOGIC, INC..

(72) Inventor(es): RAMAKRISHNA SISTA; MICHAEL G. POLLACK; VIJAY SRINIVASAN; ALLEN E. ECKHARDT; VAMSEE K. PAMULA.

(86) Pedido PCT: PCT US2008053545 de 11/02/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/098236 de 14/08/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/07/2009

(57) Resumo: MÉTODOS ATUADORES DE GOTÍCULAS EMPREGANDO ESFERAS MAGNÉTICAS Trata-se de um método para proporcionar uma gotícula em contato com uma esfera reativa à força magnética e contendo uma quantidade reduzida de uma substância. O método em geral inclui as etapas de a(a) proporcionar um atuador de gotículas compreendendo: (i) um substrato compreendendo eletrodos configurados para realizar operações de gotícula em uma superfície; (ii) uma gotícula inicial, compreendendo: (1) uma ou mais esferas reativas à força magnética; (2) uma quantidade inicial da substância; e (3) um volume inicial; (b) imobilizar magneticamente a uma ou mais esferas reativas à força magnética em uma localização que se encontra a uma distância de uma zona de divisão da gotícula alvo; (c) realizar uma ou mais operações de gotícula compreendendo operações de divisão de gotícula selecionadas para dividir a gotícula combinada para produzir um conjunto de gotícula, compreendendo: (i) uma gotícula compreendendo substancialmente todas da uma ou mais esferas reativas à força magnética e contendo uma quantidade reduzida da substância em relação à concentração inicial; e (ii) uma gotícula substancialmente sem as esferas reativas à força magnética.

“MÉTODOS ATUADORES DE GOTÍCULAS EMPREGANDO ESFERAS MAGNÉTICAS”

1 Informações de Concessão

[001] A presente invenção foi elaborada com suporte do governo sob a CA114993-01A2 e DK066956-02, concedida pelo National Institutes of Health of the United States. O Governo dos Estados Unidos detém certos direitos sobre a invenção.

2 Pedidos Relacionados

[002] O presente pedido reivindica prioridade ao, e incorpora por referência o Pedido de Patente U.S. provisório relacionado Nº 60/900,653, depositado em 9 de fevereiro de 2007, intitulado "Immobilization of magnetically-responsive beads during droplet operations"; 60/980,772, depositado em 17 de outubro de 2007, intitulado "Immobilization of magnetically-responsive beads in droplets"; 60/969,736, depositado em 4 de setembro de 2007, intitulado "Droplet actuator assay improvements"; e 60/980,762, depositado em 17 de outubro de 2007, intitulado "Droplet actuator assay improvements".

3 Campo da Invenção

[003] A invenção está relacionada, em geral, ao campo de atuadores de gotículas, e em particular, a atuadores de gotículas configurados para realizar protocolos baseados em gotículas que exigem que as operações de gotículas sejam efetuadas usando gotículas que compreendem esferas, especialmente esferas reativas à força magnética. A invenção também se refere a métodos de produção e uso de tais atuadores de gotículas.

4 Antecedentes da Invenção

[004] Os atuadores de gotículas são usados para desempenhar uma grande variedade de operações com gotículas. Um atuador de gotículas geralmente inclui um substrato, associado a eletrodos, para realizar operações com gotículas em uma superfície de operações de gotículas

do mesmo, e também pode incluir um segundo substrato disposto geralmente de forma paralela em relação à superfície de operações de gotículas para formar uma lacuna na qual as operações com gotículas são efetuadas. A lacuna é normalmente preenchida com um fluido de enchimento que é imiscível com o fluido que será submetido às operações com gotículas no atuador de gotículas.

[005] Em algumas aplicações de um atuador de gotículas, há a necessidade de usar "esferas" para vários ensaios. Para os protocolos que fazem uso de esferas, as esferas são geralmente usadas para ligar-se a uma ou mais substâncias alvo em uma mistura de substâncias. As substâncias alvo podem, por exemplo, ser analitos ou contaminantes. Há a necessidade de uma abordagem eficiente à lavagem das esferas em um atuador de gotículas de modo a reduzir a concentração de uma ou mais substâncias em uma gotícula contendo esferas que pode estar em contato com, ou exposta à superfície da esfera ou esferas.

5 Breve Descrição da Invenção

[006] Um aspecto da invenção propõe a imobilização eficaz das esferas reativas à força magnética para operações com gotículas que fazem uso de esferas reativas à força magnética em aplicações baseadas em gotículas. Exemplos incluem ensaios que exigem a execução de protocolos de lavagem de esferas, tais como aplicações de pirosequenciamento e imunoensaios. Em um exemplo, a invenção propõe técnicas que empregam forças magnéticas para imobilizar as esferas reativas à força magnética durante as operações de divisão de gotículas. As técnicas da invenção são de particular utilidade em protocolos para lavagem de esferas reativas à força magnética dentro de um atuador de gotículas. Dentre outras vantagens, as técnicas da invenção evitam a aglomeração ou agregação indevida das esferas reativas à força magnética. Durante as operações de divisão de gotículas, as técnicas podem vantajosamente mobilizar essencialmente todas as esferas reativas à força magnética dentro de uma gotícula. As técnicas da invenção

podem assegurar a imobilização e a retenção de substancialmente todas as esferas reativas à força magnética durante uma operação de lavagem de gotículas. Após o término do processo de lavagem, as técnicas da invenção asseguram a ressuspensão de substancialmente todas as esferas reativas à força magnética dentro do líquido e substancialmente sem aglomeração ou agregação das mesmas.

[007] Outro aspecto da invenção prevê atuadores de gotículas aperfeiçoados e métodos relacionados para efetuar operações de ensaio aperfeiçoadas baseadas em gotículas. As concretizações da invenção proporcionam mecanismos para reduzir o cruzamento dos campos magnéticos dentro de um atuador de gotículas. Outras concretizações da invenção proporcionam mecanismos para reduzir o sobrecarregamento de esferas e outras substâncias dentro de um atuador de gotículas. Ainda outras concretizações da invenção proporcionam mecanismos para aperfeiçoar as operações de detecção de gotículas dentro de um atuador de gotículas.

6 Definições

[008] Os seguintes termos, conforme utilizados na presente invenção, carregam os significados indicados.

[009] "Ativar", com referência a um ou mais eletrodos, significa efetuar uma alteração no estado elétrico do um ou mais eletrodos, resultando em uma operação de gotícula.

[010] "Esfera", em relação às esferas em um atuador de gotículas, significa qualquer esfera ou partícula que seja capaz de interagir com uma gotícula em um atuador de gotículas ou em proximidade deste. As esferas podem ter qualquer um dentre uma grande variedade de formatos, como esférico, largamente esférico, em forma de ovo, em forma de disco, cúbico e outras formas tridimensionais. A esfera pode, por exemplo, ser capaz de ser transportada em uma gotícula em um atuador de gotículas ou de alguma outra forma configurada em relação a um atuador de gotículas de maneira que permita que uma gotícula no atuador de gotículas seja colocada em contato

com a esfera, no atuador de gotículas e/ou fora do atuador de gotículas. As esferas podem ser fabricadas usando uma grande variedade de materiais, inclusive, por exemplo, resinas e polímeros. As esferas podem ter qualquer tamanho adequado, incluindo, por exemplo, microesferas, micropartículas, nanoesferas e nanopartículas. Em alguns casos, as esferas são reativas à força magnética; em outros casos, as esferas não são significativamente reativas à força magnética. Para as esferas reativas à força magnética, o material reativo à força magnética pode constituir substancialmente toda uma esfera ou apenas um componente de uma esfera. O restante da esfera pode incluir, dentre outras coisas, material polimérico, camadas e grupamentos que permitem a ligação de um reagente de ensaio. Exemplos de esferas reativas à força magnética adequadas são descritos na Publicação de Patente U.S. Nº 2005-0260686, intitulada "Multiplex flow assays preferably with magnetic particles as solid phase", publicada em 24 de novembro de 2005, cuja revelação na íntegra é incorporada aqui para fins de referência por seu ensinamento sobre os materiais e esferas reativos à força magnética. As esferas podem incluir uma ou mais populações de células biológicas aderidas a elas. Em alguns casos, as células biológicas são uma população substancialmente pura. Em outros casos, as células biológicas incluem diferentes populações de células, por exemplo, populações de células que interagem entre si.

[011] "Gotícula" significa um volume de líquido em um atuador de gotículas que é pelo menos parcialmente ligado a um fluido de enchimento. Por exemplo, uma gotícula pode ser completamente circundada por fluido de enchimento ou pode ser delimitada pelo fluido de enchimento e uma ou mais superfícies do atuador de gotículas. As gotículas podem assumir uma grande variedade de formatos; exemplos não-restritivos incluem geralmente em forma de disco, em forma de lama, esfera truncada, elipsóide, esférica, esfera parcialmente comprimida, hemisférica, ovóide, cilíndrica e vários formatos formados durante as operações com gotículas, tal como fusão

ou divisão, ou formadas em decorrência do contato de tais formas com uma ou mais superfícies de um atuador de gotículas.

[012] "Operação de gotícula" significa qualquer manipulação de uma gotícula em um atuador de gotículas. Uma operação de gotícula pode incluir, por exemplo: carregar uma gotícula em um atuador de gotículas; dispensar uma ou mais gotículas a partir de uma gotícula de origem; dissociar, separar ou dividir uma gotícula em duas ou mais gotículas; transportar uma gotícula de um local para outro em qualquer direção; unir ou combinar duas ou mais gotículas em uma única gotícula; diluir uma gotícula; misturar uma gotícula; agitar uma gotícula; deformar uma gotícula; reter uma gotícula numa posição; incubar uma gotícula; aquecer uma gotícula; vaporizar uma gotícula; resfriar uma gotícula; descartar uma gotícula; transportar uma gotícula para fora de um atuador de gotículas; outras operações com gotículas descritas na presente invenção; e/ou qualquer combinação das operações mencionadas. O termo "unir", "união", "combinar", "combinação", e similares, são usados para descrever a criação de uma gotícula a partir de duas ou mais gotículas. Deve-se entender que, quando tal termo for usado em referência a duas ou mais gotículas, qualquer combinação de operações de gotículas suficiente para resultar na combinação das duas ou mais gotículas em uma gotícula pode ser utilizada. Por exemplo, a "união da gotícula A com a gotícula B" pode ser obtida transportando a gotícula A para entrar em contato com uma gotícula fixa B, transportando a gotícula B para entrar em contato com uma gotícula fixa A, ou transportando as gotículas A e B para entrar em contato uma com a outra. Os termos "dissociação", "separação" e "divisão" não pretendem implicar um resultado específico em relação ao tamanho das gotículas resultantes (isto é, o tamanho das gotículas resultantes pode ser igual ou diferente) ou ao número de gotículas resultantes (o número de gotículas resultantes pode ser 2, 3, 4, 5 ou mais). O termo "mistura" se refere a operações de gotículas que resultam na distribuição mais homogênea de um ou mais componentes dentro de uma gotícula. Exemplos de operações de

"carregamento" de gotículas incluem carregamento por microdiálise, carregamento auxiliado por pressão, carregamento robótico, carregamento passivo, e carregamento por pipeta.

[013] "Imobilizar", em relação às esferas reativas à força magnética, significa que as esferas são substancialmente restritas em sua posição em uma gotícula ou em um fluido de enchimento em um atuador de gotículas. Por exemplo, em uma concretização, as esferas imobilizadas são suficientemente restritas em sua posição para permitir a execução de uma operação de divisão em uma gotícula, produzindo uma gotícula com substancialmente todas as esferas e uma gotícula substancialmente sem esferas.

[014] "Reativo à força magnética" significa que reage a um campo magnético. "Esferas reativas à força magnética" incluem ou são compostas de materiais reativos à força magnética. Exemplos de materiais reativos à força magnética incluem materiais paramagnéticos, materiais ferromagnéticos, materiais ferrimagnéticos e materiais metamagnéticos. Exemplos de materiais paramagnéticos adequados incluem ferro, níquel e cobalto, bem como óxidos metálicos, tal como Fe_3O_4 , $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$, CoO , NiO , Mn_2O_3 , Cr_2O_3 , e CoMnP .

[015] A "lavagem", em relação à lavagem de uma esfera reativa à força magnética, significa reduzir a quantidade e/ou concentração da uma ou mais substâncias em contato com a esfera reativa à força magnética ou exposta à esfera reativa à força magnética a partir de uma gotícula em contato com a esfera reativa à força magnética. A redução na quantidade e/ou concentração da substância pode ser parcial, substancialmente completa, ou até mesmo completa. A substância pode ser qualquer uma dentre uma grande variedade de substâncias; exemplos incluem substâncias alvo para análise adicional, e substâncias indesejadas, tais como componentes de uma amostra, contaminantes e/ou reagente em excesso. Em algumas concretizações, uma operação de lavagem começa com uma gotícula

inicial em contato com uma esfera reativa à força magnética, em que a gotícula inclui uma quantidade inicial e uma concentração inicial de uma substância. A operação de lavagem pode prosseguir usando uma variedade de operações de gotículas. A operação de lavagem pode produzir uma gotícula incluindo a esfera reativa à força magnética, em que a gotícula tem uma quantidade total e/ou concentração da substância que é inferior à quantidade inicial e/ou à concentração da substância. Outras concretizações são descritas noutras partes neste documento, e ainda outras ficarão imediatamente evidentes em vista da presente revelação.

[016] Os termos "superior" e "inferior" são usados em toda a descrição com referência aos substratos superior e inferior do atuador de gotículas apenas por conveniência, uma vez que o atuador de gotículas é funcional, seja qual for sua posição no espaço.

[017] Quando um dado componente, tal como uma camada, região ou substrato, é tido aqui como sendo disposto ou formado "em" outro componente, esse dado componente pode estar diretamente no outro componente, ou, como alternativa, componentes intermediários (por exemplo, um ou mais revestimentos, camadas, intercamadas, eletrodos ou contatos) também podem estar presentes. Será entendido também que os termos "disposto no" e "formado no" são usados intercambiavelmente para descrever como um determinado componente é posicionado ou situado em relação a outro componente. Portanto, os termos "disposto no" e "formado no" não têm a intenção de introduzir quaisquer limitações em relação aos métodos específicos de transporte, deposição ou fabricação de material.

[018] Quando um líquido em qualquer forma (por exemplo, uma gotícula ou um corpo contínuo, seja ele móvel ou fixo) for descrito como estando "no", "em" ou "sobre" um eletrodo, arranjo, matriz ou superfície, tal líquido poderia estar ou em contato direto com o eletrodo / arranjo / matriz / superfície, ou poderia estar em contato com uma ou mais

camadas ou filmes dispostos entre o líquido e o eletrodo / arranjo / matriz / superfície.

[019] Quando uma gotícula for descrita como estando "em" ou "carregada em" um atuador de gotículas, deve-se entender que a gotícula é disposta no atuador de gotículas de uma forma que facilita o uso do atuador de gotículas para realizar uma ou mais operações de gotículas sobre a gotícula, a gotícula é disposta no atuador de gotículas de uma forma que facilita a medição de uma propriedade ou de um sinal da gotícula e/ou a gotícula foi submetida a uma operação de gotícula no atuador de gotículas.

7 Breve Descrição dos Desenhos

[020] As Figuras 1A e 1B ilustram a primeira e segunda vistas de cima, respectivamente, de uma parte de um atuador de gotículas em uso durante uma primeira e segunda fase, respectivamente, de uma operação de divisão de gotícula;

[021] As Figuras 2A e 2B ilustram uma vista lateral e de cima de uma seção de um atuador de gotículas que inclui um ímã que é colocado em uma posição que está distante da zona de divisão;

[022] A Figura 3 ilustra uma vista lateral de uma seção de um atuador de gotículas que inclui dois ímãs que são dispostos acima e abaixo da gotícula;

[023] As Figuras 4A e 4B ilustram vistas laterais de uma seção de um atuador de gotículas que inclui quatro ímãs que são dispostos em posições que circundam a gotícula;

[024] As Figuras 5A e 5B ilustram a primeira e segunda vistas de cima, respectivamente, de uma seção de um atuador de gotículas durante uma primeira e segunda fase, respectivamente, de uma operação de divisão de gotículas;

[025] A Figura 6 ilustra uma vista lateral de uma seção de um atuador de gotículas que inclui uma blindagem magnética para reduzir o cruzamento dos campos magnéticos;

[026] A Figura 7 ilustra uma vista de cima de uma seção de um atuador de gotículas que inclui um ímã com pólos que são dispostos opostamente para reduzir o cruzamento dos campos magnéticos;

[027] A Figura 8 ilustra um mapa dos campos magnéticos que são dispostos em uma relação, tal como a ilustrada na Figura 7;

[028] A Figura 9 ilustra uma vista de cima de uma seção de um atuador de gotículas disposto de forma a reduzir o sobrecarregamento em uma região de detecção de gotículas;

[029] As Figuras 10A e 10B ilustram uma vista de cima de uma seção de um atuador de gotículas configurado para reduzir o sobrecarregamento;

[030] As Figuras 11A, 11B 11C ilustram vistas laterais da seção de um atuador de gotículas configurado para melhorar a sensibilidade da detecção de gotícula;

[031] A Figura 12 ilustra uma vista de cima de uma seção de um atuador de gotículas configurado para melhorar a sensibilidade da detecção de gotícula;

[032] A Figura 13 ilustra uma vista lateral de uma seção de um atuador de gotículas configurado para melhorar a sensibilidade da detecção de gotícula;

[033] As Figuras 14A e 14B ilustram vistas de cima de um conjunto atuador de gotículas modular, que proporciona um conjunto universal para orientar uma montagem de ímãs para um atuador de gotículas; e

[034] A Figura 15 ilustra uma vista lateral de um conjunto atuador de gotículas modular, que é outro exemplo não-limitante de um conjunto universal para orientar uma montagem de ímãs para um atuador de gotículas.

8 Descrição Detalhada da Invenção

[035] A presente invenção se refere, entre outras coisas, a atuadores de gotículas configurados para imobilizar esferas reativas à força magnética e a métodos de produção e uso de tais atuadores de gotículas. Como exemplo, os atuadores de gotículas são úteis para imobilizar esferas em gotículas nos atuadores de gotículas, com isso facilitando a execução de protocolos que exigem a imobilização de tais esferas, tais como protocolos de lavagem de esferas. A invenção também proporciona técnicas para reduzir ou eliminar o sobrecarregamento de substâncias de gotícula a gotícula em um atuador de gotículas e técnicas para maximizar a detecção de sinal em um atuador de gotículas.

8.1 Perda de Esferas Durante a Divisão de Gotícula

[036] As **Figuras 1A e 1B** ilustram a primeira e segunda vistas de cima, respectivamente, de um atuador de gotículas 100 em uso durante uma primeira e segunda fase, respectivamente, de uma operação de divisão de gotícula; O atuador de gotículas 100 faz uso de uma configuração que *não* é própria para a divisão eficiente de uma gotícula usando a técnica específica ilustrada sem perda de esferas reativas à força magnética. O atuador de gotículas 100 inclui um primeiro substrato 110 e um segundo substrato (não ilustrado) dispostos com uma lacuna entre eles, que serve de caminho de fluido. O primeiro substrato 110 inclui um conjunto de eletrodos de operação de gotícula 112 configurados para realizar operações de gotícula na gotícula em forma de bala 114, que é suspensa em um fluido de enchimento e inclui esferas reativas à força magnética 116. Um ímã 118 pode ser disposto em proximidade suficiente com os eletrodos de operação de gotícula 112 para permitir certo grau de imobilização das esferas reativas à força magnética 116.

[037] As Figuras 1A e 1B mostram uma operação de divisão que está ocorrendo na presença de um campo magnético produzido dentro do atuador de gotículas 100 pelo ímã 118. A colocação do ímã 118 não é adequada para localizar substancialmente todas as esferas reativas à força magnética 116 em uma localização centralizada (por exemplo, distante das

bordas da gotícula) dentro da parte da gotícula 114 que é selecionada para reter as esferas após a operação de divisão. Consequentemente, uma certa quantidade de esferas reativas à força magnética 116 preenchem a zona de divisão 120 durante a operação de divisão de gotícula, como mostra a Figura 1A, resultando numa perda de esferas, como mostra a Figura 1B. A Figura 1B mostra uma primeira gotícula 122 que contém uma certa quantidade da quantidade original de esferas reativas à força magnética 116 e uma segunda gotícula 124 que contém uma certa quantidade restante da quantidade original de esferas reativas à força magnética 116. Em outras palavras, o resultado final da operação de divisão ilustrada é uma perda de esferas reativas à força magnética 116. Os inventores descobriram que um fator que contribui para a perda de esferas é que uma quantidade total de esferas reativas à força magnética 116 não é atraída, imobilizada e retida de maneira adequada em uma localização centralizada dentro da gotícula 114 e/ou a uma distância suficiente da zona de divisão 120.

8.2 Configurações de Ímãs para Prevenção/Redução da Perda de Esferas

[038] Entre outras coisas, a invenção proporciona atuadores de gotículas aperfeiçoados que possuem várias configurações de ímãs, em que ímãs são dispostos para dividir de forma eficaz gotículas contendo esferas e lavar esferas reativas à força magnética, descritas com referências às Figuras 2, 3, 4, 5A e 5B. Essas figuras ilustram exemplos não limitantes de configurações de ímãs em combinação com um atuador de gotículas dividindo gotículas com pouca ou nenhuma perda de esferas, e são, entre outras coisas, úteis para lavar de forma eficiente esferas reativas à força magnética. Um ou mais ímãs podem ser dispostos em proximidade a uma gotícula em um atuador de gotículas de modo que as esferas reativas à força magnética sejam atraídas e imobilizadas de forma adequada dentro da gotícula, de preferência em uma localização centralizada longe do gargalo que se forma durante as operações de divisão. Nessa abordagem, todas ou

substancialmente todas as esferas reativas à força magnética são retidas dentro de uma única gotícula após o término de uma operação de divisão de gotícula. De modo similar, a operação de divisão pode ser realizada em uma gotícula que está a uma distância das esferas imobilizadas suficiente para reduzir ou eliminar a perda de esferas. Como será explicado em relação aos exemplos abaixo, um ou mais ímãs podem ser dispostos em relação à estrutura do atuador de gotículas acima, abaixo e/ou ao lado da gotícula contendo esferas reativas à força magnética, e quaisquer combinações desses para chegar a esse objetivo.

8.2.1 Posição do Ímã em relação à Zona de Divisão

[039] As **Figuras 2A e 2B** ilustram vistas lateral e de cima de um atuador de gotículas 200. Nesta concretização, o ímã é colocado em uma posição que é suficientemente distante da parte da gotícula que está se rompendo durante a operação de divisão, a zona de divisão 224 (ou vice versa, pode-se dizer que a zona de divisão é colocada a uma distância suficiente da posição do ímã), para reduzir ou eliminar a perda de esferas durante uma operação de divisão de gotícula. Além disso, o ímã é posicionado de modo que as esferas sejam localizadas centralmente ao longo de um diâmetro lateral L da gotícula (vista de cima). O atuador de gotículas 200 inclui um primeiro substrato 210 e um segundo substrato 212 separados para proporcionar uma lacuna para efetuar operações de gotículas, embora apenas um substrato seja necessário. Um conjunto de eletrodos de operação de gotícula 214 é associado a um ou ambos os substratos e configurado para realizar uma ou mais operações de gotícula. O atuador de gotículas 200 pode incluir um ímã 216 que é disposto em proximidade suficiente à gotícula 218/222 para substancialmente imobilizar as esferas reativas à força magnética 220 durante uma operação de divisão de gotícula. Por exemplo, o ímã pode ser configurado como um componente do atuador de gotículas e/ou em proximidade suficiente com o atuador de gotículas para imobilizar as esferas reativas à força magnética na gotícula 218/222 na lacuna. A gotícula 218/222

pode ser circundada por um fluido de enchimento (não ilustrado). A gotícula 218/222 contém uma quantidade de esferas reativas à força magnética 220 imobilizadas pelo ímã 216.

[040] O ímã 216 é posicionado em relação a um ou mais eletrodos de operação de gotícula 214, de modo a localizar as esferas 220 em uma região da parte da gotícula 218/222 que irá formar a gotícula 218 sem permitir a perda substancial de esferas 218 durante a operação de divisão de gotícula para a gotícula 222.

[041] Em operação, uma operação de divisão é obtida sem perda substancial de esferas magnéticas 220 graças, como ilustrado em 201, à provisão de um atuador de gotículas 200 com eletrodos ativados (ON) para formar a gotícula combinada 218/222 e o ímã 216, e o ímã 216 é disposto em uma posição que faz com que substancialmente todas as esferas reativas à força magnética 220 serem atraídas ao ímã 216 em uma zona da gotícula 218/222 que impede a perda substancial de esferas reativas à força magnética 220 para a gotícula 222. O ímã 216 pode ser disposto de modo que as esferas reativas à força magnética 220 atraídas estejam localizadas em uma localização geralmente centralizada ao longo do diâmetro lateral L dentro da gotícula combinada 218/222 e distante da zona de divisão de gotícula 224. Durante uma operação de divisão de gotícula, como ilustrado em 202, um eletrodo intermediário é desativado (OFF), provocando a divisão na zona de divisão 224. Substancialmente todas as esferas reativas à força magnética 220 são retidas na gotícula 218, e a gotícula 222 é formada e está substancialmente livre de esferas reativas à força magnética 220, como ilustrado em 203.

[042] Um processo para lavagem das esferas reativas à força magnética 220 pode, em uma concretização, envolver a repetição das operações de união de gotículas (com uma gotícula de lavagem), imobilização de esferas, divisão e ressuspensão de esferas até serem atingidos níveis aceitáveis de lavagem.

8.2.2 Configuração com Dois Ímãs para Produzir uma Coluna de Esferas

[043] A **Figura 3** ilustra uma vista lateral de um atuador de gotículas 300. O atuador de gotículas 300 é geralmente configurado como descrito na Figura 2, exceto que ele inclui dois ímãs, o ímã 310a e 310b, dispostos abaixo e acima da gotícula 218. Os ímãs podem ser integrados ao atuador de gotículas 300 e/ou dispostos em estreita proximidade com o lado externo do primeiro substrato 210 e do segundo substrato 212. Em geral, os ímãs 310a e 310b podem ser dispostos de modo que os pólos opostos estejam voltados um para o outro. Em um exemplo, o pólo positivo ou norte do ímã 310a está voltado para o pólo negativo ou sul do ímã 310b, como mostra a Figura 3.

[044] Os ímãs 310a e 310b podem ser ímãs separados, ou, como alternativa, os ímãs 310a e 310b podem ser pólos opostos de um único ímã permanente ou eletroímã em forma de ferradura, em forma de "U" ou em forma de "C". A disposição dos ímãs 310a e 310 pode fazer com que as esferas reativas à força magnética 220 sejam imobilizadas e retidas em um agrupamento em forma de coluna. Os ímãs são preferencialmente configurados para localizar as esferas dentro da gotícula 218 em uma posição que está distante da zona de divisão 224 na parte da gotícula combinada (não ilustrada) em que as esferas serão retidas. Além disso, os ímãs são preferencialmente alinhados para localizar centralmente as esferas ao longo do diâmetro lateral L dentro da gotícula combinada (não ilustrada).

8.2.3 Múltiplos Pares de Ímãs para Centralizar as Esferas

[045] As **Figuras 4A e 4B** ilustram vistas laterais de um atuador de gotículas 400. O atuador de gotículas 400 é geralmente configurado como o atuador de gotículas 200 descrito na Figura 2, com a exceção de que ele inclui quatro ímãs dispostos em posições circundando a gotícula. Em geral, essa disposição ilustra a concretização em que múltiplos pares de ímãs com

pólos positivos/negativos voltados um para o outro são configurados para localizar de forma geralmente centralizada as esferas 220 na gotícula combinada antes da divisão. Como ilustrado na Figura 4B, as esferas estão geralmente localizadas centralmente ao longo de uma dimensão vertical V e uma dimensão lateral L. No exemplo ilustrado, o atuador de gotículas 400 inclui quatro ímãs, tal como um ímã 410a, 410b, 410c e 410d.

[046] Os ímãs 410a e 410b podem ser dispostos em estreita proximidade com a gotícula, igualmente espaçados em ambos os lados da gotícula, com pólos opostos voltados um para o outro. Por exemplo, o pólo norte do ímã 410a pode estar voltado para o pólo sul do ímã 410b. Os ímãs 410c e 410d podem ser dispostos em estreita proximidade com a gotícula, igualmente espaçados em ambos os lados da gotícula, com pólos opostos voltados um para o outro. Por exemplo, o pólo norte do ímã 410a pode estar voltado para o pólo sul do ímã 410b. O par de ímãs 410a/410b pode geralmente ser alinhado horizontalmente em volta da gotícula em relação ao par de ímãs 410c/410d. Na concretização ilustrada, o par de ímãs 410a/410b tem uma orientação vertical ao redor da gotícula, e o par de ímãs 410c/410d tem uma orientação horizontal ao redor da gotícula. Qualquer orientação ao redor da gotícula que atinja a localização geralmente central das esferas ao longo da dimensão lateral L e da dimensão vertical V será suficiente para obter a imobilização central desejada.

[047] Os ímãs 410a e 410b podem ser dispostos em estreita proximidade com o lado externo do primeiro substrato 210 e do segundo substrato 212, respectivamente, de modo que o campo magnético dos ímãs 410a e 410b possa passar através da lacuna entre o primeiro substrato 210 e o segundo substrato 212 do atuador de gotículas 400. Os ímãs 410a e 410b são dispostos de modo que os pólos opostos estejam voltados um para o outro. Em um exemplo, o pólo norte do ímã 410a está voltado para o pólo sul do ímã 410b, como mostra a Figura 4. De modo similar, os ímãs 410c e 410d são dispostos em estreita proximidade com um primeiro lado e um segundo

lado, respectivamente, do atuador de gotículas 400, de modo que o campo magnético dos ímãs 410c e 410d possa passar através da lacuna do atuador de gotículas 400 e perpendicular ao campo magnético dos ímãs 410a e 410b. Os ímãs 410c e 410d são dispostos de modo que os pólos opostos estejam voltados um para o outro. Em um exemplo, o pólo norte do ímã 410d está voltado para o pólo sul do ímã 410c, como mostra a Figura 4.

[048] Os ímãs 410a e 410b podem ser ímãs separados, ou, como alternativa, os ímãs 410a e 410b podem ser pólos opostos de um único ímã permanente ou eletroímã em forma de ferradura, em forma de "U" ou em forma de "C". De modo similar, os ímãs 410c e 410d podem ser ímãs separados, ou, como alternativa, os ímãs 410c e 410d podem ser pólos opostos de um único ímã permanente ou eletroímã em forma de ferradura, em forma de "U" ou em forma de "C". Visto que o campo magnético dos ímãs 410a e 410b e dos ímãs 410c e 410d, respectivamente, cruza-se no centro do caminho de fluido dentro do atuador de gotículas 400, as esferas reativas à força magnética 220 são imobilizadas magneticamente e retidas em um aglomerado que está centralizado dentro da gotícula combinada e retido na gotícula 218 após a operação de divisão.

8.2.4 Ilustração da Divisão sem substancialmente nenhuma Perda de Esfera

[049] As **Figuras 5A e 5B** ilustram uma primeira e segunda vistas de cima, respectivamente, de um atuador de gotículas 500 em uso durante uma primeira e segunda fase, respectivamente, de uma operação de divisão de gotícula. O atuador de gotículas 500 pode, como alternativa, ser configurado como qualquer um dos atuadores de gotículas exemplificativos 200, 300 e 400. O atuador de gotículas 500 das Figuras 5A e 5B faz uso de forças magnéticas que são configuradas adequadamente para uso em uma operação de divisão projetada para resultar na retenção substancialmente completa das esfera em uma única gotícula, tal como um processo para lavar esferas reativas à força magnética.

[050] Em particular, as Figuras 5A e 5B mostram uma operação de divisão que está ocorrendo a uma distância suficiente das esferas localizadas 220 para permitir uma operação de divisão que resulte na retenção substancialmente completa das esferas reativas à força magnética na gotícula 218 e numa gotícula que esteja substancialmente livre de esferas reativas à força magnética. A posição da face do ímã 510 é configurada adequadamente para imobilizar magneticamente substancialmente todas as esferas reativas à força magnética 220 em uma localização centralizada dentro da gotícula e a uma distância da zona de divisão que seja suficiente para obter a retenção desejada das esferas reativas à força magnética 220 na gotícula 218. Como resultado, substancialmente nenhuma quantidade de esferas reativas à força magnética 220 liga-se a uma zona de divisão 512 durante a operação de divisão de gotícula, como mostra a Figura 5A, não ocorrendo substancialmente nenhuma perda de esferas. A Figura 5B mostra a gotícula 218 que contém substancialmente todas as esferas reativas à força magnética 220. Em outras palavras, o resultado final de uma operação de divisão que ocorre substancialmente fora das forças dos ímãs é que não há substancialmente nenhuma perda de esferas reativas à força magnética 220 porque substancialmente todas as esferas reativas à força magnética 220 são adequadamente atraídas, imobilizadas e retidas em uma localização centralizada dentro do fluido.

8.3 Configurações do Atuador de Gotículas com Ímãs

8.3.1 Atuador de Gotículas com Blindagem Magnética

[051] A **Figura 6** ilustra uma vista lateral de um atuador de gotículas 600 que inclui uma blindagem magnética para reduzir o cruzamento dos campos magnéticos. O atuador de gotículas 600 inclui uma placa superior 610 e uma placa inferior 614 que são dispostas com uma lacuna 618 entre elas. Uma configuração dos eletrodos 622, por exemplo, eletrodos de eletroumectação, pode ser associada à placa inferior 614 para realizar operações de gotícula, e um eletrodo, tal como o eletrodo de reservatório 626,

que está associado a um reservatório de fluido 630 que contém uma quantidade de fluido 634. Uma ou mais gotículas (não ilustradas) podem ser dispensadas da quantidade de fluido 634 do reservatório 630 para manipulação ao longo dos eletrodos 622. Além disso, o fluido 634 e quaisquer gotículas dispensadas dele podem opcionalmente conter esferas (não ilustradas), que podem, em alguns casos, serem reativas à força magnética.

[052] O atuador de gotículas 600 adicionalmente inclui um ímã 638 que é disposto em proximidade com o um ou mais eletrodos 622. O ímã 638 pode ser disposto em proximidade suficiente com os eletrodos 622 a fim de permitir a imobilização das esferas reativas à força magnética (não ilustradas), por exemplo, em uma gotícula posicionada em um eletrodo. Em um exemplo, o objetivo do ímã 638 é imobilizar magneticamente e reter as esferas reativas à força magnética durante uma operação de divisão de gotícula, por exemplo, uma operação de divisão que pode ser realizada em um processo para lavagem de esferas reativas à força magnética.

[053] Além disso, o atuador de gotículas 600 inclui uma blindagem magnética 642 que é disposta em proximidade suficiente com o reservatório de fluido 630 para proteger seu conteúdo dos campos magnéticos próximos, tal como o campo magnético do ímã 638. A blindagem magnética 642 pode, por exemplo, ser formado de Mu-metal, que possui permeabilidade magnética suficientemente alta e que é adequado para reduzir, de preferência substancialmente eliminar, campos magnéticos indesejados do ímã dentro do reservatório de fluido 630. Em um exemplo, a blindagem magnética 642 pode ser formada de Mu-metal, fornecido pela McMaster-Carr (Elmhurst, IL). Outros exemplos de materiais de blindagem magnética 642 incluem Permalói, ferro, aço e níquel.

[054] O atuador de gotículas 600 não se limita apenas a uma blindagem magnética e um ímã; qualquer quantidade de blindagens magnéticas e ímãs pode ser instalada nele. Portanto, pelo uso de uma ou mais blindagens magnéticas, a exposição das esferas magnéticas (não ilustradas)

dentro das gotículas aos campos magnéticos pode ser limitada apenas às regiões desejadas do atuador de gotículas 600. As blindagens magnéticas podem ser incluídas em qualquer superfície do atuador de gotículas e em qualquer disposição que facilite a blindagem adequada.

[055] Em um exemplo de aplicação, um atuador de gotículas pode ser empregado para realizar múltiplos ensaios em paralelo, e, conseqüentemente, pode haver a necessidade de lavagem geralmente simultânea das várias esferas magnéticas que podem ser manipuladas dentro das várias pistas de eletrodos. Sem as blindagens magnéticas, uma operação de lavagem ou ensaio que é realizado em uma certa localização usando um ímã associado pode ser afetada pelo campo magnético de um ímã distante (isto é, ocorre o cruzamento dos campos magnéticos). Em contrapartida, o cruzamento dos campos magnéticos entre dois ímãs qualquer pode ser reduzido, de preferência substancialmente eliminado, via a colocação estratégica de uma ou mais blindagens magnéticas, tal como a blindagem magnética 642, dentro do atuador de gotículas.

8.3.2 Atuador de Gotículas com Configuração de Ímãs

Alternados

[056] A **Figura 7** ilustra uma vista de cima de um atuador de gotículas 700 que inclui um ímã cujos pólos são dispostos opostamente para reduzir o cruzamento dos campos magnéticos. O atuador de gotículas 700 inclui uma configuração de eletrodos 710, por exemplo, eletrodos de eletroumectação, para realizar operações de gotícula em uma ou mais gotículas (não ilustradas). Além disso, um ímã 714 é disposto em estreita proximidade com uma primeira pista de eletrodos 710, um ímã 718 é disposto em estreita proximidade com uma segunda pista de eletrodos 710, um ímã 722 é disposto em estreita proximidade com uma terceira pista de eletrodos 710, e um ímã 726 é disposto em estreita proximidade com uma quarta pista de eletrodos 710. Os ímãs 714, 718, 722 e 726 podem ser dispostos em proximidade suficiente com os eletrodos 710 de modo a permitir a imobilização

das esferas reativas à força magnética (não ilustradas) dentro de uma ou mais gotículas (não ilustradas) localizadas em um ou mais dos eletrodos.

[057] De modo a reduzir, de preferência substancialmente eliminar, o cruzamento dos campos magnéticos entre os ímãs adjacentes, os pólos dos ímãs adjacentes são dispostos opostamente, o que causa o cancelamento dos campos magnéticos adjacentes. Por exemplo e referindo-se novamente à Figura 7, o pólo norte do ímã 722 é orientado para cima, e o pólo sul do ímã 726 é orientado para cima. Dessa maneira, os campos magnéticos são cancelados e o cruzamento dos campos magnéticos entre os ímãs 714, 718, 722 e 726 pode ser reduzido, de preferência substancialmente eliminado.

[058] A **Figura 8** ilustra um mapa 800 dos campos magnéticos dispostos em uma relação, tal como a ilustrada na Figura 7.

8.4 Outras Técnicas

[059] A invenção também oferece técnicas para reduzir o sobrecarregamento em um atuador de gotícula, além de técnicas para aperfeiçoar as operações de detecção.

8.4.1 Técnica para Reduzir o Sobrecarregamento em um Atuador de Gotículas

[060] A **Figura 9** ilustra uma vista de cima de um atuador de gotículas 900 pelo qual uma operação para reduzir o sobrecarregamento em uma região de detecção de gotícula pode ser realizada. O atuador de gotículas 900 inclui uma configuração dos eletrodos 910, por exemplo, eletrodos de eletroumectação, para submeter as gotículas a operações de gotícula. Além disso, o atuador de gotículas 900 inclui uma região de detecção designada 914 em, por exemplo, um certo eletrodo 910. A região de detecção 914 é usada para detectar gotículas posicionadas no mesmo ou passando através do mesmo durante as operações de gotícula. Em um exemplo, a detecção de gotículas é realizada usando um tubo fotomultiplicador (PMT) ou PMT de contagem de fótons que está associado à

região de detecção 914. Um PMT (não ilustrado) é usado para medir a luz (isto é, detectar fótons) emitida por uma gotícula (por exemplo, devido à fluorescência e/ou quimioluminescência) quando no eletrodo que está associado à região de detecção 914. Em alguns casos, um acúmulo de substâncias em uma região de detecção, tal como a região de detecção 914, pode ocorrer devido ao sobrecarregamento, que envolve esferas ou outras substâncias sendo deixadas para trás nas superfícies e/ou no fluido de enchimento durante as operações de gotícula. O sobrecarregamento pode interferir na detecção precisa dos sinais a partir das gotículas subsequentes e/ou pode interferir nas operações de gotícula pelos eletrodos afetados.

[061] Referindo-se novamente à Figura 9, uma operação de sequenciamento de gotícula da invenção reduz, de preferência substancialmente elimina, o sobrecarregamento na região de detecção 914 mediante uma série de gotículas de ensaio 918 e gotículas de lavagem 922 alternadas. Em um exemplo, uma gotícula de ensaio 918a passa através da região de detecção 914, seguida de uma gotícula de lavagem 922a, seguida de uma gotícula de ensaio 918b, seguida de uma gotícula de lavagem 922b, seguida de uma gotícula de ensaio 918c, seguida de uma gotícula de lavagem 922c, seguida de uma gotícula de ensaio 918d, que é seguida de uma gotícula de lavagem 922d. Uma vez que as gotículas 918a, 918b, 918c e 918d têm o potencial de degradar a função da região de detecção 914 devido ao cruzamento, as gotículas de lavagem 922a, 922b, 922c e 922d realizam uma operação de limpeza das superfícies que estão associadas à região de detecção 914. O processo de limpeza da invenção não se limita à sequência que é ilustrada na Figura 9. Qualquer sequência é possível, contanto que a sequência inclua um número adequado de gotículas de lavagem de modo a limpar adequadamente a região de detecção. Por exemplo, dependendo das exigências do ensaio específico, várias gotículas de lavagem podem ser proporcionadas entre as gotículas de ensaio e/ou múltiplas gotículas de ensaio podem ser proporcionadas entre as gotículas de lavagem, por exemplo,

AAWAAWAAW, AAWAAWAAW. AWWAWWWWW,
 AWWAWWWWWWWWW. AAWWAAWAAWAAW,
 AAWWWAAWAAWAAWAAW, etc., sendo que A = gotícula de ensaio e W = gotícula de lavagem. Deve-se notar que não é necessário que as gotículas de ensaio e lavagem tenham o mesmo tamanho. As gotículas de ensaio podem ser maiores ou as gotículas de lavagem podem ser maiores. A gotícula maior pode ser submetida a operações de gotícula, tal como uma lama (por exemplo, uma lama ocupando 4 eletrodos) ou como uma única gotícula grande (por exemplo, uma gotícula 4X ocupando quantos eletrodos ela cobrir naturalmente sem ser formada em uma lama). Cada configuração pode resultar em um resultado de limpeza diferente. Também não é necessário que as gotículas de ensaio e as gotículas de lavagem sigam o mesmo caminho. Por exemplo, seus caminhos podem se cruzar na localização que precisa ser limpa.

[062] As **Figuras 10A e 10B** ilustram uma vista de cima de um atuador de gotículas 1000 pelo qual outra operação para reduzir o sobrecarregamento pode ser realizada. O atuador de gotículas 1000 inclui uma configuração de eletrodos 1010, por exemplo, eletrodos de eletroumectação, para realizar operações de gotícula em uma ou mais gotículas, tais como as gotículas de ensaio 1014 e 1018 (Figura 10A) e a gotícula de lavagem 1022 (Figura 10B). Além disso, um ímã 1026 é disposto em estreita proximidade com um certo eletrodo 1010. O ímã 1026 pode ser disposto em proximidade suficiente com o certo eletrodo 1010 de modo a permitir a imobilização das esferas reativas à força magnética dentro de uma ou mais gotículas, tais como as esferas magnéticas 1030 dentro da gotícula de ensaio 1014.

[063] Durante, por exemplo, uma operação de divisão de gotícula, uma quantidade de gotículas "satélite" pode ser deixada para trás no ponto em que ocorre a divisão. Por exemplo, e referindo-se à Figura 10A, uma operação de divisão de gotículas pela qual a gotícula de ensaio 1014 é formada pela divisão da gotícula de ensaio 1018 pode resultar em uma certa quantidade de gotículas satélite 1034 sendo deixadas para trás em um certo

eletrodo 1010. As gotículas satélite, tais como as gotículas satélite 1034, podem ser a fonte de sobrecarregamento (contaminação cruzada) de uma gotícula para outra, o que não é desejado. A Figura 10B ilustra que uma gotícula de lavagem, tal como a gotícula de lavagem 1022, pode ser transportada ao longo dos eletrodos 1010 após as operações de ensaio, por exemplo, das gotículas de ensaio 1018 e 1014 de modo a capturar as gotículas satélite 1034 e transportá-las para longe antes de ocorrer a próxima operação de ensaio. Dessa forma, os eletrodos 1010 são limpos entre as operações de ensaio. O processo de limpeza da invenção não se limita à sequência que é ilustrada nas Figuras 10A e 10B. Qualquer sequência é possível, contanto que a sequência inclua um número adequado de gotículas de lavagem de modo a limpar adequadamente os eletrodos.

8.4.2 Aperfeiçoamento das Operações de Detecção em um Atuador de Gotículas

[064] As **Figuras 11A, 11B e 11C** ilustram vistas laterais do atuador de gotículas 1100 pelo qual as respectivas operações para aperfeiçoar a sensibilidade da detecção de gotículas podem ser realizadas. O atuador de gotículas 1100 inclui uma placa superior 1110 e uma placa inferior 1114 que são dispostas com uma lacuna 1118 entre elas. Uma configuração dos eletrodos 1222, por exemplo, eletrodos de eletroumectação, pode ser associada à placa inferior 1114 para realizar operações de gotícula em uma gotícula 1126. Uma janela PMT 1130 pode ser associada à placa superior 1110, pela qual um PMT (não ilustrado) é usado para medir a luz (isto é, detectar os fótons 1134) emitidos pela gotícula 1126.

[065] A Figura 11A mostra um método para aperfeiçoar a sensibilidade da detecção de gotícula pelo espalhamento de uma gotícula, tal como a gotícula 1126, de modo a aumentar a área de superfície que é exposta à janela do PMT 1130 e, dessa forma, aumentar o número de fótons 1134 que podem ser detectados. Uma gotícula pode ser espalhada linearmente ao longo de um ou mais eletrodos 1222, dependendo do volume da gotícula. No caso de

uma gotícula de pequeno volume, uma gotícula de enchimento pode ser adicionada para tornar a gotícula maior, contanto que as perdas devido à diluição pela gotícula de enchimento sejam compensadas pela maior área de gotícula exposta ao PMT. Por exemplo, a Figura 11B mostra a gotícula 1126 que é espalhada continuamente ao longo de múltiplos eletrodos 1122, o que aumenta o número de fótons 1134 que podem atingir a janela do PMT 1130 e podem ser detectados pelo PMT.

[066] A Figura 11C mostra uma situação em que a gotícula 1126 é dividida em várias gotículas 1126, tais como as gotículas 1126a, 1126b, 1126c e 1126d que estão em múltiplos eletrodos 1122. Novamente, a área de superfície que é exposta à janela do PMT 1130 é aumentada, o que aumenta o número de fótons 1134 que podem atingir a janela do PMT 1130 e que podem ser detectados pelo PMT. Como alternativa e referindo-se novamente às Figuras 11A, 11B, 11C, o espalhamento de uma gotícula, tal como a gotícula 1126, não se limita apenas ao espalhamento linear. A gotícula pode ser espalhada em duas dimensões, tal como através de uma grade ou arranjo de eletrodos 1122, de modo a aumentar a área de superfície que é exposta à janela do PMT 1130. Como alternativa, um ou mais eletrodos de área grande podem ser proporcionados, ao longo dos quais uma ou mais gotículas podem ser espalhadas.

[067] A **Figura 12** ilustra uma vista de cima de um atuador de gotículas 1200 para aperfeiçoar a sensibilidade da detecção de gotícula. O atuador de gotículas 1200 inclui uma configuração dos eletrodos 1210, por exemplo, eletrodos de eletroumectação, para realizar operações de gotícula nas múltiplas gotículas 1214.

[068] Além disso, o atuador de gotículas 1200 pode incluir uma região de detecção de gotícula 1218 que tem um PMT associado (não ilustrado) para medir a luz que é emitida de uma certa gotícula 1214, quando presente. De modo a reduzir, de preferência substancialmente eliminar, o sobrecarregamento da luz de uma gotícula distante 1214 para a região de

detecção de gotícula 1218, uma distância mínima d é mantida em todas as direções entre o perímetro externo da região de detecção de gotícula 1218 e quaisquer gotículas distantes 1214 dentro do atuador de gotícula 1200, como mostra a Figura 12. A distância mínima d é suficientemente grande para reduzir, de preferência eliminar substancialmente, o sobrecarregamento da luz de uma gotícula distante 1214 para a região de detecção de gotícula 1218. Como resultado, em um atuador de gotículas que inclui múltiplas gotículas 1214, um espaçamento é mantido durante a detecção entre a gotícula alvo 1214 que está sendo medida e uma gotícula distante 1214, de modo que o sobrecarregamento de luz da gotícula distante 1214 para a região de detecção de gotícula 1218 seja reduzido, de preferência substancialmente eliminado. Como um caso específico, a distância d é um múltiplo inteiro m de um tamanho de eletrodo unitário, e a detecção de gotícula pode ser realizada em um conjunto de eletrodos, os quais são conectados eletricamente como um barramento faseado m . Como alternativa, a Figura 13 (descrita abaixo) descreve uma situação em que a área física de um atuador de gotículas é limitada, e, portanto, o espaçamento suficiente entre as gotículas, como descrito na Figura 12, pode não ser alcançado.

[069] Em uma concretização alternativa, o cruzamento das gotículas adjacentes é eliminado pelo uso de elementos ópticos, tais como uma ou mais lentes, que focalizam apenas a luz proveniente das gotículas sendo interrogadas no sensor e elimina o sinal das outras gotículas.

[070] A **Figura 13** ilustra uma vista lateral de um atuador de gotículas 1300 para aperfeiçoar a sensibilidade da detecção de gotícula. O atuador de gotículas 1300 inclui uma placa superior 1310 e uma placa inferior 1314 que são dispostas com uma lacuna 1318 entre elas. Uma configuração dos eletrodos 1322, por exemplo, eletrodos de eletroumectação, pode ser associada à placa inferior 1314 para realizar operações de gotícula nas gotículas, tal como uma gotícula 1326 e uma gotícula 1330. Uma janela PMT 1334 pode ser associada à placa superior 1310, pela qual um PMT (não

ilustrado) é usado para medir a luz (isto é, detectar os fótons 1338) emitidos, por exemplo, pela gotícula 1326. Uma vez que o espaçamento entre, por exemplo, a gotícula 1326 na janela PMT 1334 e uma gotícula distante 1330 não é adequadamente suficiente para evitar o sobrecarregamento de luz da gotícula 1330 para a janela do PMT 1334, uma máscara 1342 é disposta sobre a placa superior 1310. A finalidade da máscara 1342 é impedir a luz de uma gotícula distante de passar para a janela do PMT 1334, que é a região de detecção de uma gotícula alvo.

[071] A máscara 1342 pode ser formada sobre a placa superior 1310 via uma camada de qualquer material absorvedor de luz, contanto que o material utilizado seja compatível com o processo de eletroumectação e não interfira indevidamente nas operações do atuador de gotículas. Em um exemplo, a máscara 1342 pode ser formada pela aplicação de uma camada de tinta preta à placa superior 1310, de modo que uma ou mais janelas, tal como a janela PMT 1334, sejam dispostas nas regiões de detecção selecionadas do atuador de gotículas 1300. No exemplo ilustrado na Figura 13, a máscara 1342 reduz, de preferência substancialmente elimina, a transferência da luz da gotícula distante 1330 para a gotícula alvo 1326 na janela do PMT 1334. Em outro exemplo, a máscara 1342 é formada por um condutor opaco no lado da placa superior 1310 que está voltado para a gotícula. O condutor pode ser, por exemplo, alumínio, cromo, cobre ou platina. O condutor pode adicionalmente servir de um eletrodo de referência elétrica.

8.5 Atuadores de Gotículas com Conjuntos de Ímãs

[072] As **Figuras 14A e 14B** ilustram vistas de cima de um conjunto atuador de gotículas modular 1400, que é um exemplo não-limitante de um conjunto universal para orientar uma montagem de ímãs para um atuador de gotículas. O conjunto atuador de gotículas modular 1400 pode incluir, por exemplo, um suporte 1410, uma montagem de ímãs 1420 e um atuador de gotículas 1430. A Figura 14A mostra o conjunto atuador de

gotículas modular 1400, quando desmontado. A Figura 14B mostra o conjunto atuador de gotículas modular 1400, quando montado.

[073] A montagem de ímãs 1420 pode incluir um substrato 1424, sobre o qual é montado um ou mais ímãs 1428, como mostra a Figura 14A. Os ímãs 1428 podem ser permanentemente afixados no substrato 1424 ou podem ser removíveis. Os ímãs removíveis 1428 facilitam a seleção, pelo usuário, de ímãs com as propriedades desejadas, tal como a potência de ímã desejada. Em uma concretização, um instrumento atuador de gotículas é provido de um conjunto atuador de gotículas 1400 incluindo um suporte 1410 e uma montagem de ímãs 1420 sem ímãs. Em outra concretização, o usuário também é provido de ímãs com propriedades especificadas, que podem ser afixados pelo usuário na montagem de ímãs 1420. Em outra concretização, o usuário também é provido de conjuntos de ímãs tendo várias características especificadas, de modo que o usuário possa selecionar um conjunto de um ou mais ímãs tendo propriedades desejadas e afixar o conjunto selecionado na montagem de ímãs 1420.

[074] Os ímãs podem ser marcados ou codificados (por exemplo, codificados com cores) para facilitar a seleção de ímãs com propriedades apropriadas, e também marcados para mostrar a orientação do campo magnético do ímã (por exemplo, por codificação com cores ou algum outro tipo de marcação nas faces Norte e Sul dos ímãs). De modo similar, a montagem de ímãs 1420 pode ser marcada para mostrar a orientação desejada dos ímãs inseridos nela, e em algumas concretizações, os ímãs podem ser formados de modo a permitir que eles sejam afixados na montagem de ímãs 1420 apenas em uma orientação apropriada.

[075] Além do mais, em outra concretização, o usuário pode ser provido de montagens de ímãs 1420 com ímãs já afixados nela, sendo que cada uma das montagens de ímãs 1420 possui diferentes configurações de ímãs, por exemplo, conjuntos de ímãs com propriedades diferentes. O usuário pode selecionar a configuração de ímãs que inclui ímãs

com propriedades apropriadas ao uso a que se destina o instrumento. A montagem de ímãs 1420 pode ser marcada ou de algum outro modo codificada com cores para facilitar a seleção do usuário. As propriedades dos ímãs podem, por exemplo, ser escolhidas com base nas propriedades das esferas selecionadas pelo usuário.

[076] O atuador de gotículas 1430 pode incluir um substrato 1434 sobre o qual está uma disposição de eletrodos 1438, por exemplo, eletrodos de eletroumectação, como mostra a Figura 14A. Um segundo substrato (superior) também pode ser incluído (não ilustrado).

[077] A montagem de ímãs 1420 é projetada de modo que os ímãs 1428 se alinhem substancialmente com certos eletrodos 1438 de interesse no atuador de gotículas 1430. Por exemplo, em algumas concretizações, configurações paralelas dos ímãs podem estar presentes para realizar etapas de ensaio paralelas no atuador de gotículas 1430. Os ímãs podem ser configurados e orientados, por exemplo, de acordo com as várias configurações e orientações descritas aqui.

[078] O suporte 1410 pode servir de plataforma universal para montar uma montagem de ímãs, tal como a montagem de ímãs 1420, e um atuador de gotículas, tal como o atuador de gotículas 1430. Em uma concretização, o suporte 1410 é configurado para receber uma grande variedade de montagens de ímãs 1420 e uma grande variedade de atuadores de gotículas 1430. A montagem de ímãs 1420 pode incluir um ou mais ímãs dispostos em qualquer um dentre uma variedade de padrões e empregando qualquer uma dentre uma variedade de propriedades de ímãs. A Figura 14 ilustra uma fileira de ímãs, mas os ímãs também podem ser dispostos em uma grade ou qualquer configuração que coloque os ímãs em sua posição apropriada em relação ao atuador de gotículas 1430 de modo a facilitar as operações desejadas no atuador de gotículas.

[079] Em um exemplo, a montagem de ímãs 1420 e o atuador de gotículas 1430 podem ser instalados no suporte 1410 via os

respectivos encaixes 1418 e 1414. Os encaixes podem, por exemplo, envolver fendas dentro das quais o suporte 1410 pode ser encaixado, aberturas no suporte 1410 para receber hastes nas montagens de ímãs 1420 ou vice versa, aberturas no suporte 1410 para receber parafusos nas montagens de ímãs 1420, hastes roscadas para receber parafusos, vários mecanismos sob ação de mola, bandejas rebaixadas, encaixes complementares, entre outros. Qualquer mecanismo que facilite a fixação suficientemente segura para permitir que o dispositivo funcione para o fim a que se destina será suficiente.

[080] Além disso, o suporte 1410 pode incluir vários encaixas para várias posições possíveis da montagem de ímãs 1420 e/ou do atuador de gotículas 143 e/ou da montagem de várias montagens de ímãs 1420 e/ou vários atuadores de gotículas 1430 em um único suporte 1410. Além disso, o suporte 1410 pode ser configurado para permitir que as montagens de ímãs 1420 sejam montadas acima, abaixo e/ou ao lado do atuador de gotículas 1430, isto é, em qualquer relação com o atuador de gotículas. Com o atuador de gotículas 1430 instalado no suporte modular 1410, qualquer montagem de ímãs de interesse, tal como a montagem de ímãs 1420, pode ser inserida no conjunto atuador de gotículas modular 1400 via, por exemplo, a fenda.

[081] A **Figura 15** ilustra uma vista lateral de um conjunto atuador de gotículas modular 1500, que é outro exemplo não-restritivo de um conjunto universal para orientar uma montagem de ímãs em um atuador de gotículas, similar ao conjunto 1400 ilustrado na Figura 14, com a exceção de que o suporte 1410 é substituído por um suporte 1510. O suporte 1510 inclui bandejas rebaixadas nas quais a montagem de ímãs 1420 e o atuador de gotículas 1430 podem ser encaixados de modo a proporcionar um método de carregamento do tipo "encaixe".

[082] Referindo-se às Figuras 14A, 14B e 15, um aspecto da invenção é que as fendas ou outros meios de conexão servem para orientar o substrato dos ímãs e o atuador de gotículas de modo a alinhar os ímãs na montagem de ímãs com os eletrodos apropriados ou caminhos de

eletrodos no atuador de gotículas. Dessa maneira, os ímãs podem ser removidos quando não forem necessários para um ensaio. Além disso, diferentes suportes de ímãs com diferentes distribuições de ímãs podem ser utilizados para diferentes tipos de ensaios ou diferentes estruturas do atuador de gotículas.

8.6 Ímãs

[083] Além dos outros aspectos já descritos, deve-se notar que os ímãs selecionados para uso com a invenção podem ser permanentes ou eletroímãs. Pode haver uma relação entre o conteúdo reativo à força magnética das esferas na gotícula e a resistência magnética/força de atração. Portanto, a resistência magnética / força de atração do ímã pode ser selecionada em relação à reatividade das esferas magnéticas, de modo que ela seja:

suficientemente forte em relação à reatividade magnética das esferas para substancialmente imobilizar as esferas reativas à força magnética;

não tão forte em relação à reatividade magnética das esferas a ponto de magnetizar significativamente as esferas, causando, assim, a formação irreversível de aglomerados de esferas;

não tão forte em relação à reatividade magnética das esferas a tal ponto que a ressuspensão ocorre fracamente quando o campo magnético é removido; e/ou

não tão forte em relação à reatividade magnética das esferas que as esferas são retiradas da gotícula juntas.

[084] Em algumas concretizações, o ímã pode ter alta resistência magnética (em Tesla) com menos força de atração (em libras). Em um exemplo, o ímã é um ímã permanente de neodímio que tem uma força de campo de superfície de cerca de 1 Tesla (T). Em outro exemplo, o ímã é um eletroímã que tem uma força de campo de superfície de cerca de 1 T, que pode ser ativada e desativada eletronicamente. Quando um ímã permanente é

utilizado, o ímã pode ser movido para longe da gotícula contendo esferas reativas à força magnética para usos nos quais se deseja remover a influência do campo magnético. Embora não se limitam às seguintes faixas, entende-se que as faixas de resistência magnética que geralmente abrangem a resistência útil da presente invenção podem incluir: uma faixa ampla de 0,01 T a 100 T (pulsada) ou 45 T (contínua); uma faixa intermediária de 0,01 T a 10 T; e uma faixa estreita de 0,1 T a 1 T (de preferência 0,5 T).

8.7 Composição da Gotícula

[085] As gotículas incluindo esferas magnéticas e sujeitas a operações de divisão de gotícula podem incluir qualquer uma dentre uma grande variedade de amostras, reagentes e tampões úteis para realizar ensaios usando as esferas. Por exemplo, durante a lavagem, a gotícula pode incluir um tampão, tal como um tampão fosfato salino (PBS) com um surfactante que é adequado para uso em imunoensaios baseados em campo magnético. Os surfactantes preferidos são aqueles que facilitam a imobilização e/ou ressuspensão de esferas após a imobilização por forças magnéticas. O surfactante e a quantidade de surfactante podem ser ajustados para proporcionar um aperfeiçoamento substancial na ressuspensão quando comparado a uma solução controle sem o surfactante. Em uma concretização, a gotícula inclui tampão PBS com cerca de 0,01% Tween® 20.

[086] Um polímero hidrófilo e/ou surfactante pode ser incluído na gotícula para facilitar a retenção e ressuspensão de esferas reativas à força magnética durante a operação de divisão. A gotícula pode incluir uma grande variedade de líquidos imiscíveis com o fluido de enchimento. Exemplos de tampões incluem, sem a isto se limitar, tampão fosfato salino (PBS) e tampão Tris salino. Em uma concretização, o fluido da gotícula inclui um tampão, tal como o tampão PBS, e qualquer surfactante que seja adequado para uso em imunoensaios baseados em campos magnéticos.

[087] Os polímeros hidrófilos preferidos são aqueles que facilitam a ressuspensão das esferas após a imobilização por forças

magnéticas. O surfactante e a quantidade de surfactante podem ser ajustados para proporcionar um aperfeiçoamento substancial na ressuspensão quando comparado a uma solução controle sem o surfactante. Exemplos de surfactantes adequados para uso nos imunoensaios baseados em campos magnéticos incluem, mas sem a isto se limitar, polisorbato 20, comercializado como Tween® 20, e Triton X-100. O Tween® 20 pode ser fornecido, por exemplo, pela Pierce Biotechnology, Inc. (Woburn, MA). O Triton® X-100 pode ser fornecido, por exemplo, pela Rohm & Haas Co (Filadélfia, PA). Em um exemplo, o fluido de gotícula dentro do atuador de gotículas é uma mistura de PBS com Tween® 20 na faixa de cerca de 0,001% a cerca de 0,1%. Em outro exemplo, o fluido de gotícula dentro do atuador de gotículas é uma mistura de PBS com cerca de 0,01% de Tween® 20.

[088] Outros exemplos incluem surfactantes plurônicos, polietileno glicol (PEG), metoxipolietileno glicol (MPEG), poli-sorbato (monooleatos de polioxietileno sorbitano ou Tween®), polioxietileno octil fenil éter (Triton X-100®), polivinil pirrolidona, ácido poliacrílico (e ácido poliacrílico reticulado, tal como um carbômero), poliglicosídeos (surfactantes glicosídicos não-iônicos, tal como octil glicopiranosídeo) e polissacarídeos solúveis (e seus derivados), tal como heparina, dextranos, metil celulose, propil metil celulose (e outros ésteres e éteres de celulose), dextrinas, maltodextrinas, galactomananas, arabinogalactanos, beta glucanos, alginatos, ágar, carragena e gomas vegetais, tal como goma xantana, psyllium, goma guar, goma tragacanto, goma caraia, goma ghatti e goma acácia. O aditivo específico pode ser selecionado visando a compatibilidade máxima com uma amostra microfluídica específica.

8.8 Atuador de Gotículas

[089] Para exemplos de arquiteturas de atuador de gotículas adequadas para uso com a presente invenção, consulte a Patente U.S. 6,911,132, intitulada, "Apparatus for Manipulating Droplets by Electrowetting-Based Techniques," depositada em 28 de junho de 2005 em

nome de Pamula e col.; Pedido de Patente U.S. Nº 11/343,284, intitulado, "Apparatuses and Methods for Manipulating Droplets on a Printed Circuit Board," depositado em 30 de janeiro de 2006; Patente U.S. 6,773,566, intitulada, "Electrostatic Actuators for Microfluidics and Methods for Using Same," expedida em 10 de agosto de 2004 e 6,565,727, intitulada, "Actuators for Microfluidics Without Moving Parts," expedida em 24 de janeiro de 2000, ambas de Shenderov e col.; e o Pedido de Patente Internacional Nº PCT/US 06/47486 de Pollack e col., intitulado, "Droplet-Based Biochemistry," depositado em 11 de dezembro de 2006, cujas revelações são incorporadas ao presente para fins de referência. Técnicas de atuador de gotículas para imobilizar esferas magnéticas e/ou esferas não-magnéticas são descritas nos pedidos de patente internacionais anteriores e em in Sista, e col., Pedido de Patente U.S. Nº 60/900,653, depositado em 9 de fevereiro de 2007, intitulado "Immobilization of magnetically-responsive beads during droplet operations"; Sista e col., Pedido de Patente U.S. Nº 60/969,736, depositado em 4 de setembro de 2007, intitulado "Droplet Actuator Assay Improvements"; e Allen e col., Pedido de Patente U.S. Nº 60/957,717, depositado em 24 de agosto de 2007, intitulado "Bead washing using physical barriers," cujas revelações na íntegra são incorporadas ao presente para fins de referência. Combinações dessas várias técnicas estão dentro do âmbito da presente invenção.

8.9 Fluidos

[090] Para exemplo de fluidos que podem ser submetidos às operações de gotícula da invenção, consulte as patentes listadas na seção 8.8, em especial o Pedido de Patente Internacional Nº PCT/US 06/47486, intitulado "Droplet-Based Biochemistry", depositado em 11 de dezembro de 2006. Em algumas concretizações, a gotícula é um fluido de amostra, tal como uma amostra biológica, tal como sangue inteiro, fluido linfático, soro, plasma,, suor, saliva, escarro, fluido cerebrospinal, fluido amniótico, fluido seminal, excreção vaginal, fluido seroso, fluido sinovial, fluido pericardial, fluido peritonal, fluido pleural, transudatos, exudatos, fluido cístico,

bile, urina, fluido gástrico, fluido intestinal, amostras fecais, tecidos fluidizados, organismos fluidizados, esfregaços biológicos e lavagens biológicas. Em algumas concretizações, o fluido que é carregado inclui um reagente, tal como água, água deionizada, soluções salinas, soluções ácidas, soluções básicas, soluções detergentes e/ou tampões. Em algumas concretizações, o fluido que é carregado inclui um reagente, tal como um reagente para um protocolo bioquímico, tal como um protocolo de amplificação de ácido nucléico, um protocolo de ensaio baseado em afinidade, um protocolo de sequencialmente e / ou um protocolo para análises de fluidos biológicos.

8.10 Fluidos de Enchimento

[091] Como se observa, a lacuna é geralmente preenchida com um fluido de enchimento. O fluido de enchimento pode, por exemplo, ser um óleo de baixa viscosidade, tal como óleo de silicone. Outros exemplos de fluidos de enchimento são apresentados no Pedido de Patente Internacional N^o PCT/US 06/47486, intitulado "Droplet-Based Biochemistry", depositado em 11 de dezembro de 2006.

8.11 Lavagem de Esferas Reativas à Força Magnética

[092] Para protocolos que fazem uso de esferas, as gotículas com esferas podem ser combinadas usando operações de gotícula com uma ou mais gotículas de lavagem. Em seguida, enquanto retendo as esferas (por exemplo, física ou magneticamente) usando as configurações de ímã da invenção, a gotícula unida pode ser dividida usando operações de gotículas, em duas ou mais gotículas: uma ou mais gotículas com esferas e uma ou mais gotículas sem uma quantidade substancial de esferas. Em uma concretização, a gotícula unida é dividida usando operações de gotícula em uma gotícula com esferas e uma gotícula sem uma quantidade substancial de esferas.

[093] Geralmente, cada execução de um protocolo de lavagem resulta na retenção de esferas suficientes para realizar o ensaio desejado sem efeitos prejudiciais indevidos nos resultados do ensaio. Em

certas concretizações, cada divisão da gotícula unida resulta na retenção de mais de 90, 95, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99, 99,9, 99,99, 99,999, 99,9999, 99,99999 ou 99,999999 por cento das esferas. Em outras concretizações, cada execução de um protocolo de lavagem para obter uma redução predeterminada na concentração e/ou quantidade da substância removida resulta na retenção de mais de 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99, 99,9. 99,99, 99,999, 99,9999, 99,99999 ou 99,999999 por cento das esferas. Em ainda outras concretizações, a quantidade de esferas retidas é calculada e os resultados são ajustados de maneira correspondente.

[094] Em algumas concretizações, as esferas podem ser lavadas em reservatórios nos quais a gotícula contendo esferas e as gotículas de lavagem são combinadas, as esferas são retidas (por exemplo, por um ímã, por estruturas físicas, forças eletrostáticas) e as gotículas sem esferas são dispensadas do reservatório usando operações de gotícula. Por exemplo, as esferas podem ser lavadas pela estratégia diluir-e-dispensar, por meio do que um tampão de lavagem é adicionado ao reservatório para diluir o conteúdo, as esferas reativas à força magnética são localizadas dentro do reservatório com um ímã e grande parte da solução é dispensada do reservatório, repetindo esse ciclo até serem atingidos níveis aceitáveis de lavagem.

[095] Como exemplo, a lavagem das esferas reativas à força magnética pode geralmente incluir as seguintes etapas:

- (1) proporcionar uma gotícula compreendendo esferas reativas à força magnética e substâncias livres em proximidade com um ímã;
- (2) usar operações de gotículas para combinar uma gotícula de lavagem com a gotícula compreendendo as esferas reativas à força magnética;
- (3) imobilizar as esferas pela aplicação de um campo magnético;

(4) usar operações de gotícula para remover toda ou parte da gotícula circundando as esferas para produzir uma gotícula compreendendo as esferas com uma concentração reduzida de componentes livres e uma gotícula compreendendo componentes livres;

(5) liberar as esferas mediante a remoção do campo magnético; e

(6) repetir as etapas (2) a (3) ou (2) a (4) até um grau predeterminado de purificação ser alcançado.

[096] Dessa forma, as substâncias livres, como contaminantes, subprodutos ou reagentes em excesso, podem ser separados das esferas. Cada ciclo produz uma gotícula incluindo as esferas, mas com um nível reduzido das substâncias indesejadas. A etapa (5) não é necessária em cada ciclo de lavagem; no entanto, ela pode ser útil para aprimorar a lavagem mediante a liberação de contaminantes que podem estar aprisionados nas esferas imobilizadas. As etapas podem ser realizadas em uma ordem diferente, por exemplo, as etapas (2) e (3) podem ser invertidas. As etapas no protocolo de lavagem podem ser realizadas em um atuador de gotículas usando operações de gotículas conforme descritas na presente invenção.

[097] Nas concretizações em que se utilizam esferas reativas à força magnética, os inventores descobriram que a aplicação de um campo magnético, embora seja útil para imobilizar temporariamente as esferas, mover as esferas e/ou posicionar as esferas, algumas vezes resulta na agregação indesejada das esferas. Como já observado, em uma concretização, um polímero hidrófilo e/ou um surfactante é incluído para prevenir ou reduzir a agregação de esferas. Os polímeros hidrófilos e surfactantes devem ser selecionados e usados em quantidades que reduzem ou eliminam a agregação de esferas e minimizam a adsorção não-específica e que ao mesmo tempo não resultam em perda significativa dos analitos alvo ou reagentes da gotícula. Em uma concretização, o polímero hidrófilo e/ou o surfactante reduzem a aglomeração de esferas em uma gotícula em um fluido de enchimento não-

gasoso e especificamente não serve para reduzir a adsorção molecular dos componentes da gotícula para uma superfície do atuador de gotículas.

[098] Outra abordagem para eliminar ou reduzir a agregação das esferas envolve o uso de quantidades menores de esferas maiores. Qualquer número de esferas que possa estar contido em uma gotícula durante uma ou mais operações de gotícula pode ser utilizado. Em algumas concretizações, o número de esferas reativas à força magnética pode variar de um a várias centenas de milhares. Por exemplo, em uma concretização, a invenção faz uso de uma a 100 esferas reativas à força magnética por gotícula. Por exemplo, a invenção pode fazer uso de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ... 100 esferas reativas à força magnética por gotícula. Em uma concretização, o número de esferas reativas à força magnética varia de um a 10. O uso de números menores de esferas reativas à força magnética permite o uso de esferas maiores. Por exemplo, em uma concretização, a invenção faz uso de uma a 100 esferas reativas à força magnética por gotícula, sendo que as esferas possuem um diâmetro médio de cerca de 25 a cerca de 100 micra. Em outra concretização, a invenção faz uso de uma a 10 esferas reativas à força magnética por gotícula, sendo que as esferas possuem um diâmetro médio de cerca de 50 a cerca de 100 micra.

9 Comentários Conclusivos

[099] A descrição detalhada anterior das concretizações se refere aos desenhos em anexo, os quais ilustram concretizações específicas da invenção. Outras concretizações com estruturas e operações diferentes não divergem do âmbito da presente invenção.

[100] O presente relatório descritivo está dividido em seções apenas visando a conveniência do leitor. Os títulos não devem ser interpretados como limitações ao âmbito da invenção.

[101] Deve-se entender que vários detalhes da presente invenção podem sofrer modificações sem divergir do âmbito da presente invenção. Além do mais, a descrição anterior serve apenas para fins

de ilustração, e não de limitação, uma vez que a presente invenção é definida pelas reivindicações apresentadas adiante.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para proporcionar uma gotícula (218) em contato com uma esfera reativa à força magnética (220) e tendo uma quantidade reduzida de uma substância, compreendendo:

(a) proporcionar um atuador de gotículas (330), compreendendo:

(i) um substrato (210) compreendendo eletrodos (214) configurados para realizar operações de gotícula em uma superfície; e

(ii) uma gotícula inicial (218/222), compreendendo:

(1) uma ou mais esferas reativas à força magnética (220);

(2) uma quantidade inicial da substância; e

(3) um volume inicial;

(b) imobilizar magneticamente a uma ou mais esferas reativas à força magnética (220) em uma localização que se encontra a uma distância de uma zona de divisão (224) da gotícula alvo; e

(c) realizar uma ou mais operações de gotícula compreendendo operações de divisão de gotícula selecionadas para dividir a gotícula inicial para produzir um conjunto de gotículas, compreendendo:

(i) uma gotícula (218) compreendendo mais de 90% da uma ou mais esferas reativas à força magnética (220) e contendo uma quantidade reduzida da substância em relação à concentração inicial; e

(ii) uma gotícula compreendendo 10% ou menos das esferas reativas à força magnética (220);

caracterizado pelo fato de que:

na etapa (b), imobilizar magneticamente a uma ou mais esferas reativas à força magnética (220) por meio de dois ímãs (310a, 310b, 410a, 410b) dispostos acima e abaixo da gotícula inicial (218/222) com pólos opostos voltados um para o outro.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a gotícula inicial (218/222) compreende uma

concentração inicial da substância, e a uma ou mais operações de gotícula produzem uma gotícula compreendendo uma concentração reduzida e quantidade reduzida da substância em relação à concentração inicial e à quantidade inicial.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por adicionalmente compreender realizar uma ou mais operações de gotícula para unir uma gotícula de lavagem com a gotícula proporcionada na etapa 1 (a) para produzir uma gotícula combinada.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por adicionalmente compreender liberar ou ressuspender uma ou mais das esferas após a etapa 1 (c).

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por adicionalmente compreender proporcionar um surfactante na gotícula capaz de melhorar a ressuspensão em relação a uma gotícula correspondente sem o surfactante.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por adicionalmente compreender agitar uma ou mais das esferas (220) após a etapa 1(c) usando um sonicador.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

(a) a etapa 1 (b) compreende localizar uma gotícula compreendendo as esferas (220) em proximidade com os ditos ímãs (310a, 310b, 410a, 410b) para efetuar um campo magnético em proximidade com um ou mais dos eletrodos (214); e

(b) a força e localização do campo magnético são selecionadas de forma a imobilizar as esferas reativas à força magnética (220) na gotícula a uma distância da zona de divisão (224) alvo que é suficiente para reter mais de 90% das esferas magnéticas (220) em uma gotícula (218).

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

(a) a etapa 1 (b) compreende localizar uma gotícula compreendendo as esferas (220) em proximidade com os ditos ímãs (310a, 310b, 410a, 410b) para efetuar um campo magnético em proximidade com um ou mais dos eletrodos (214); e

(b) a localização dos ímãs (310a, 310b, 410a, 410b) é selecionada de forma a localizar centralmente as esferas magnéticas (220) ao longo de uma dimensão lateral da gotícula.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

(a) a etapa 1 (b) compreende localizar uma gotícula compreendendo as esferas em proximidade com os ditos ímãs (310a, 310b, 410a, 410b) em proximidade com um ou mais dos eletrodos (214); e

(b) a localização dos ímãs (310a, 310b, 410a, 410b) é selecionada de forma a localizar centralmente as esferas magnéticas ao longo de uma dimensão vertical da gotícula.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa 1(b) compreende imobilizar magneticamente a uma ou mais esferas reativas à força magnética usando um meio que compreende:

(a) os ditos ímãs (310a, 310b, 410a, 410b); e

(b) um meio para mover os ímãs (310a, 310b, 410a, 410b) para uma posição com e sem proximidade com um ou mais dos eletrodos (214).

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a gotícula de 1(c)(i) compreende mais de 99% das gotículas presentes na gotícula combinada.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a gotícula de 1(c)(i) compreende mais de 99,9% das gotículas presentes na gotícula combinada.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que a etapa 1 (c) é mediada por eletrodos.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa 1 (c) é mediada por eletroumectação.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa 1 (c) é mediada por dielectroforese.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa 1 (c) é mediada por campo magnético.

17. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ímãs adicionais (410c, 410d) são fornecidos de tal forma que múltiplos pares de ímãs estão dispostos em posições envolvendo a gotícula inicial (218/222) com pólos opostos voltados um para o outro.

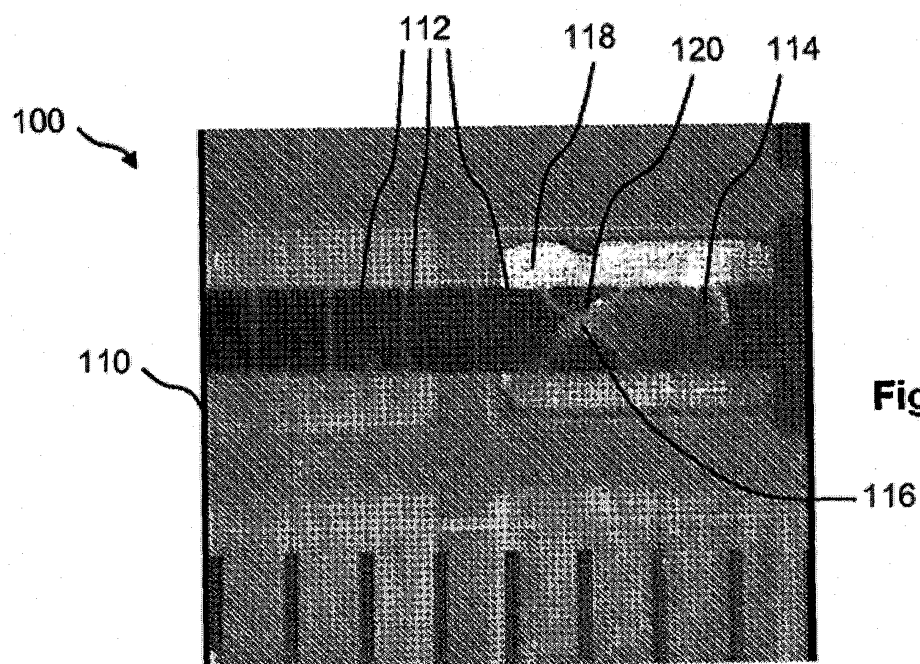


Figura 1A

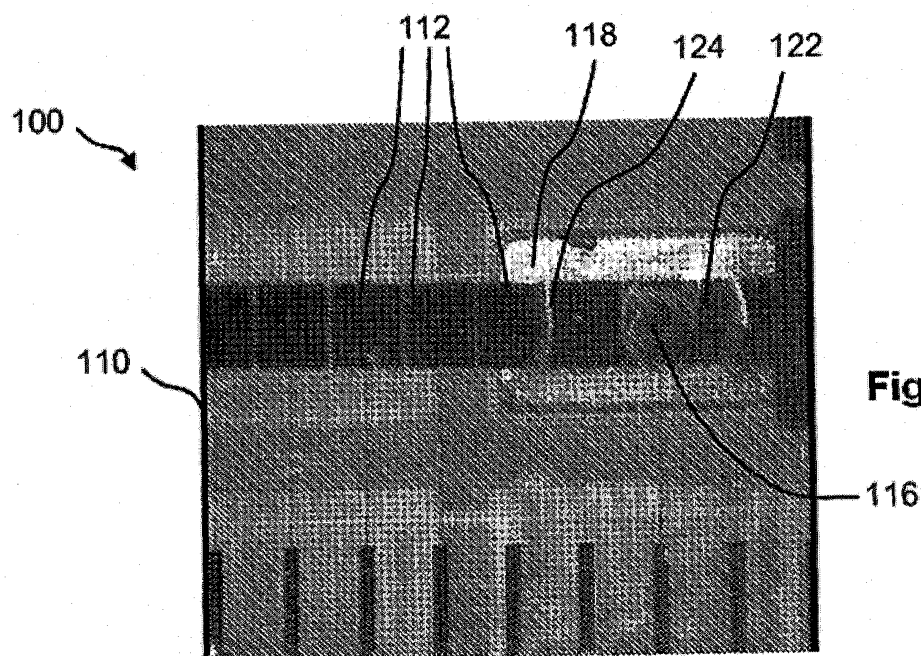


Figura 1B

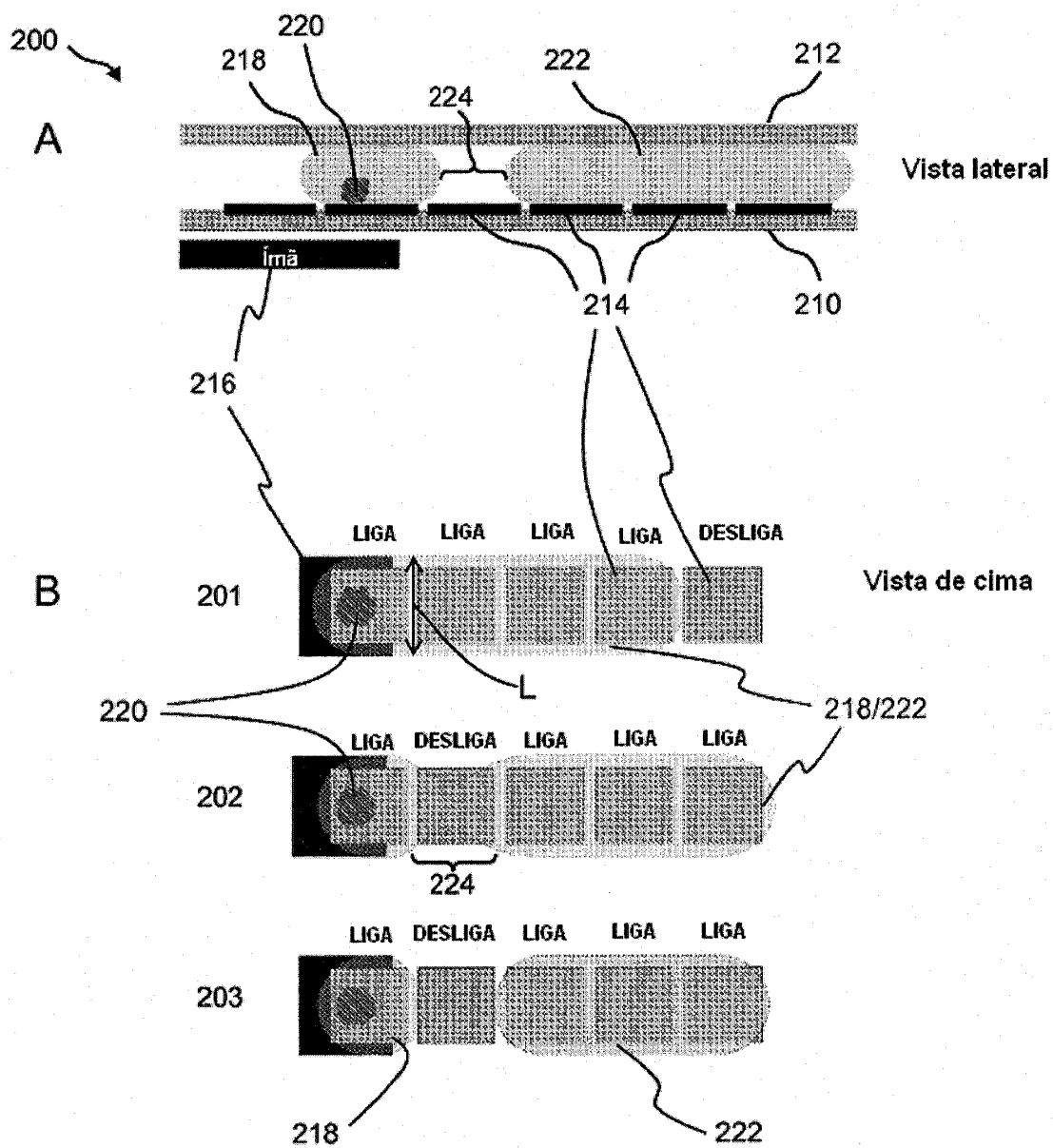
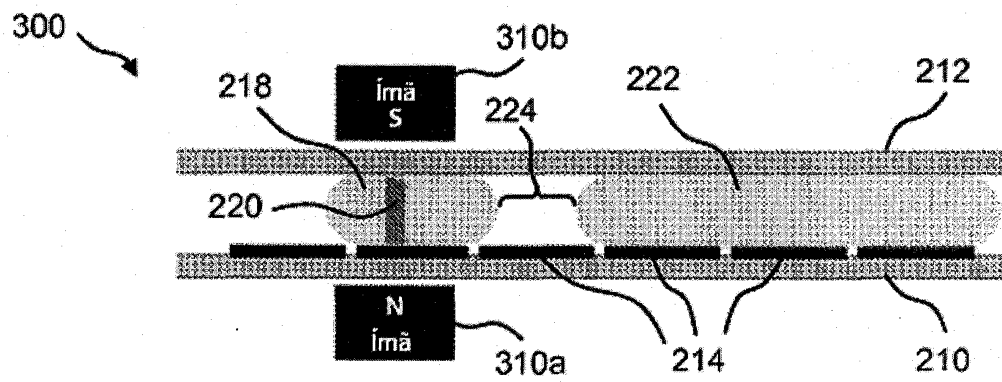
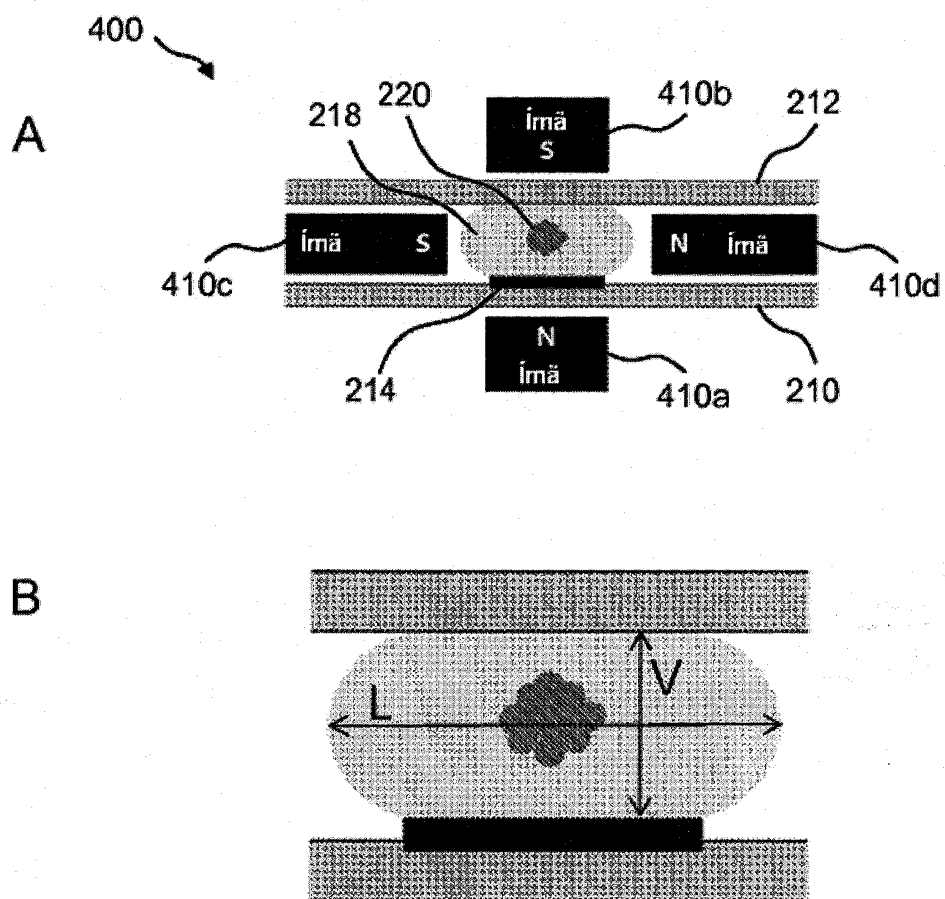


Figura 2

**Figura 3**

**Figura 4**

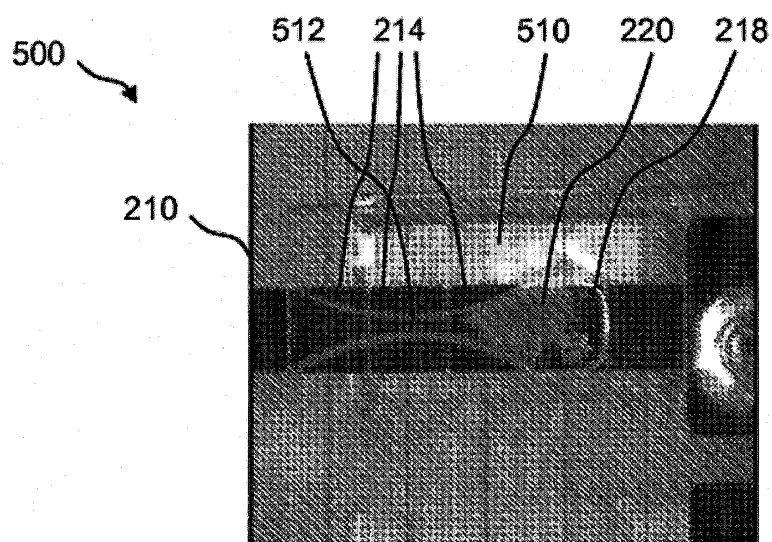


Figura 5A

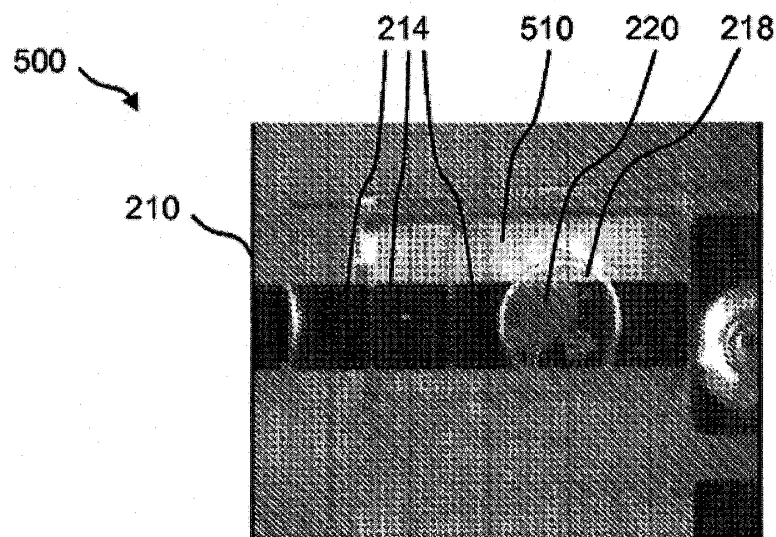
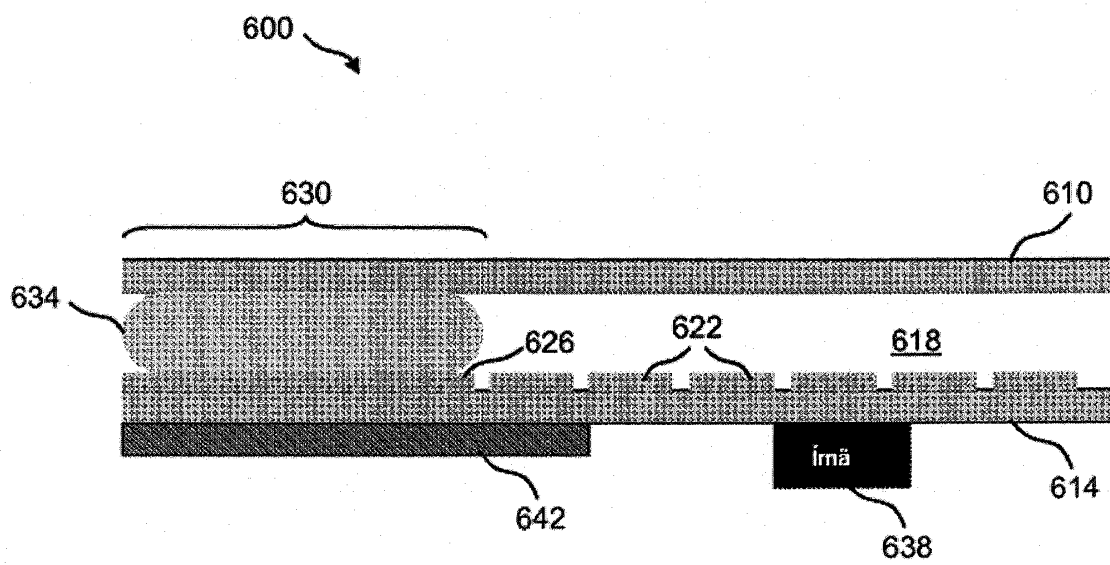
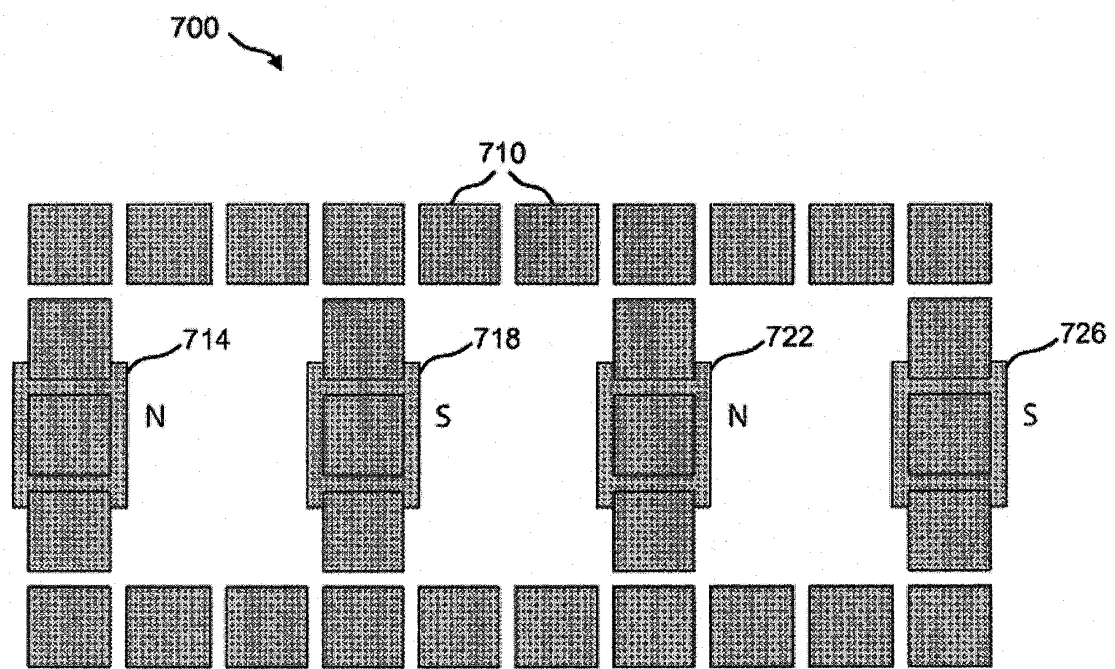


Figura 5B

**Figura 6**

**Figure 7**

800

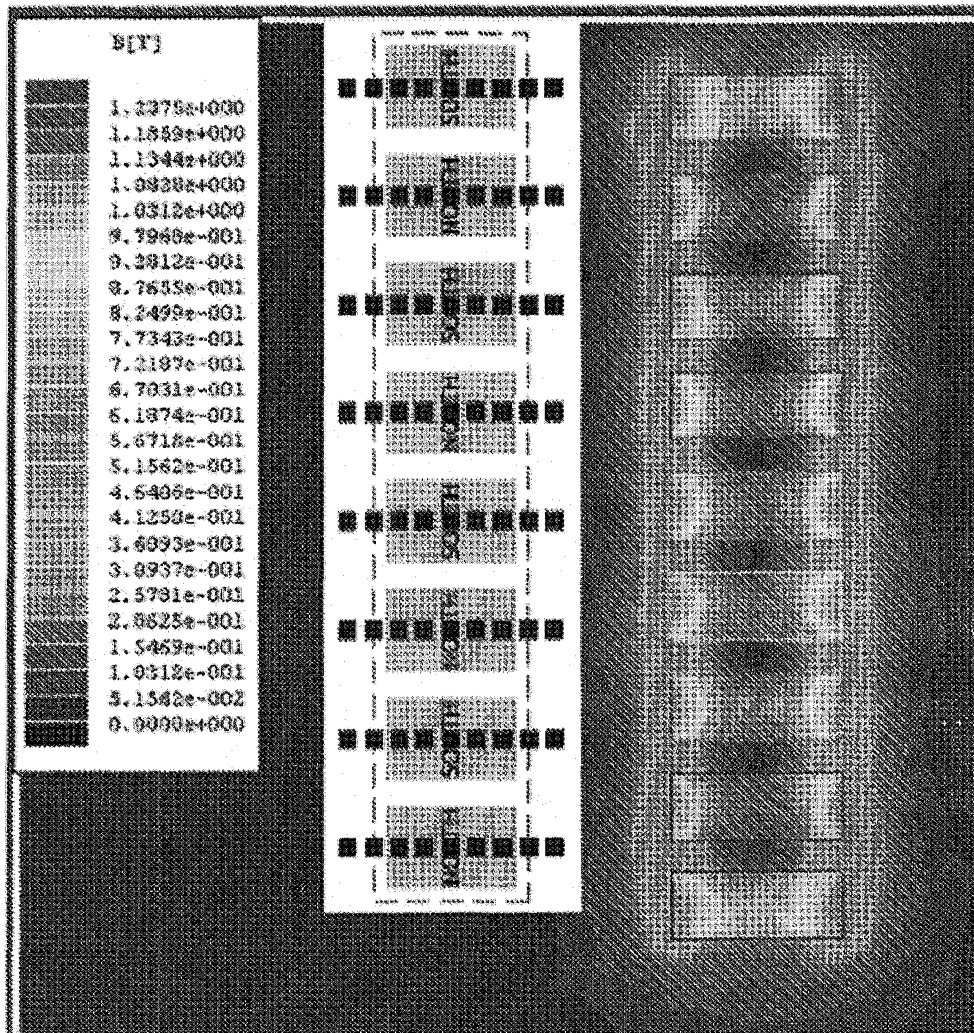


Figura 8

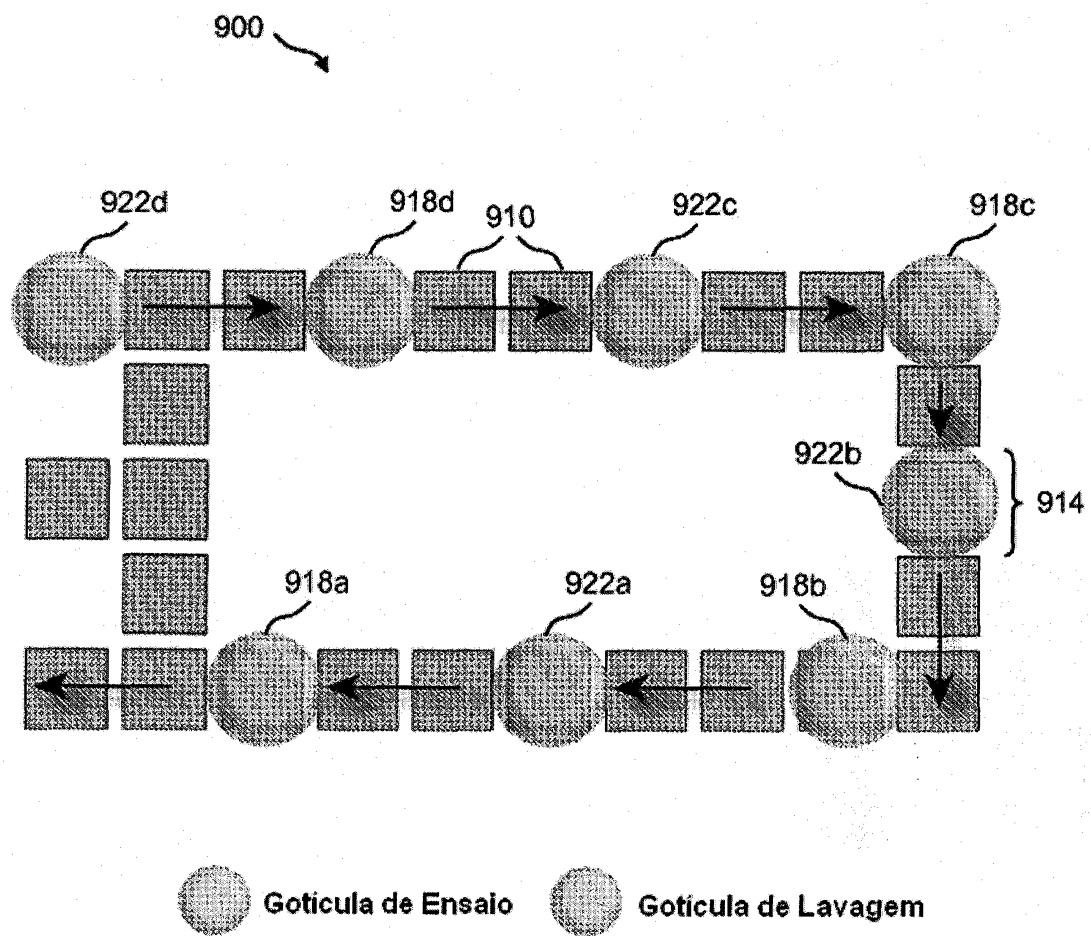


Figura 9

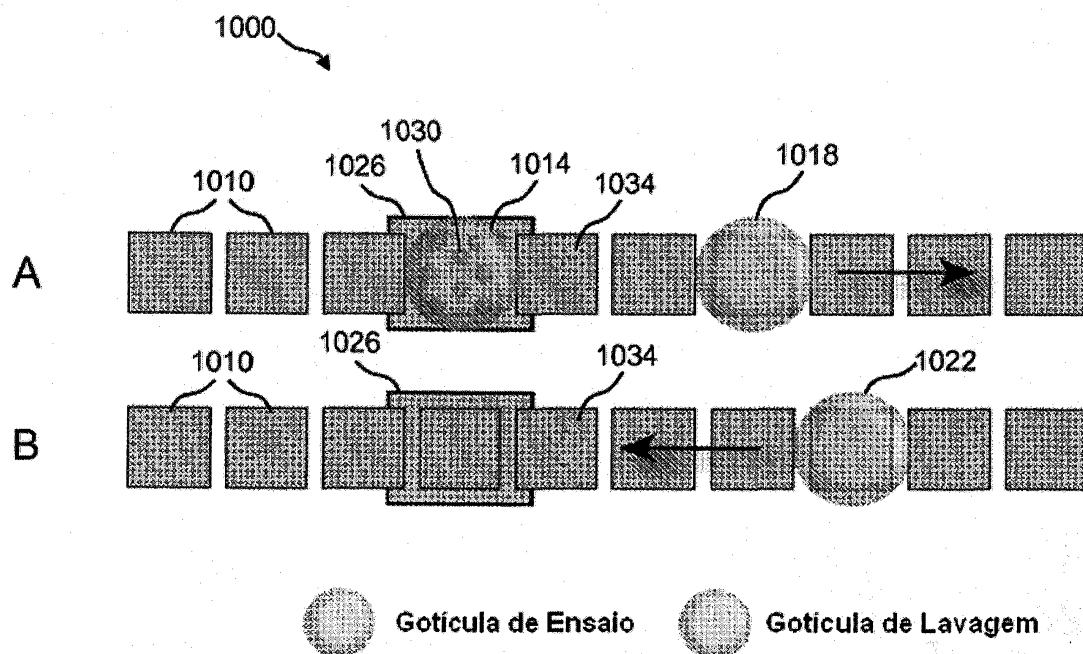
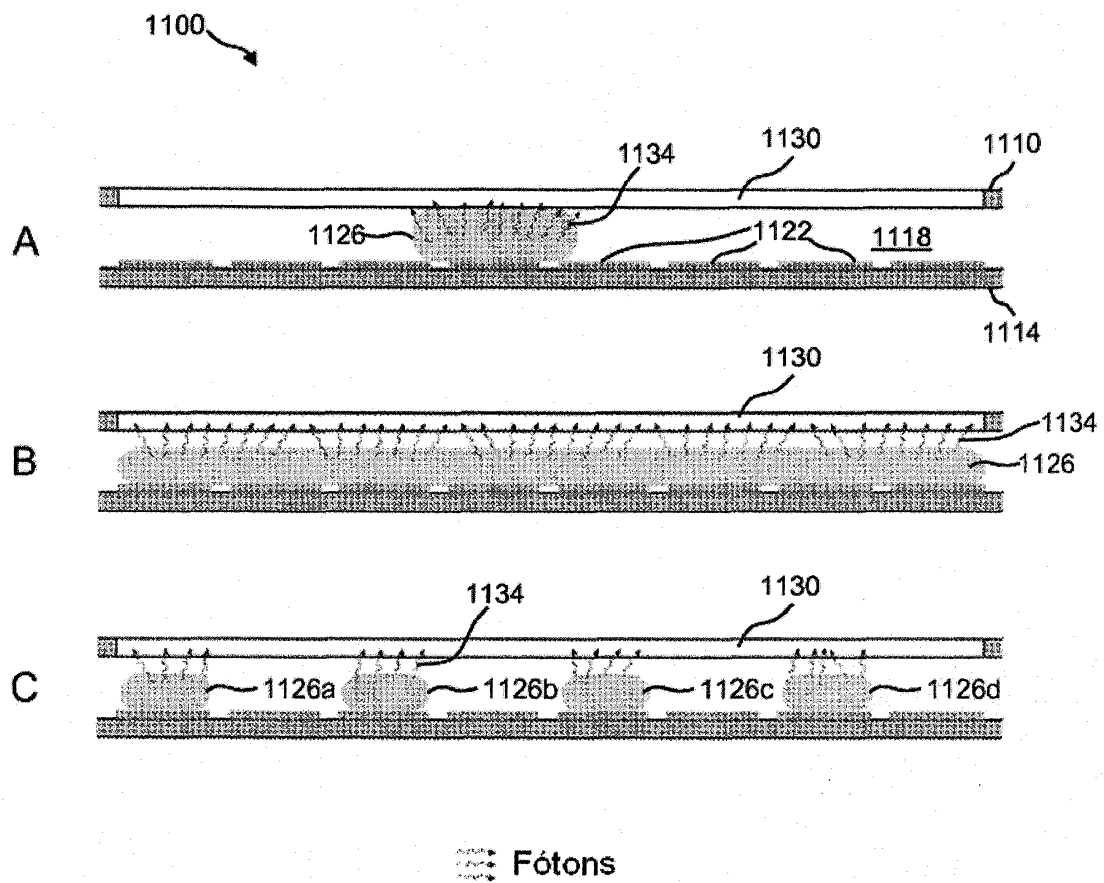
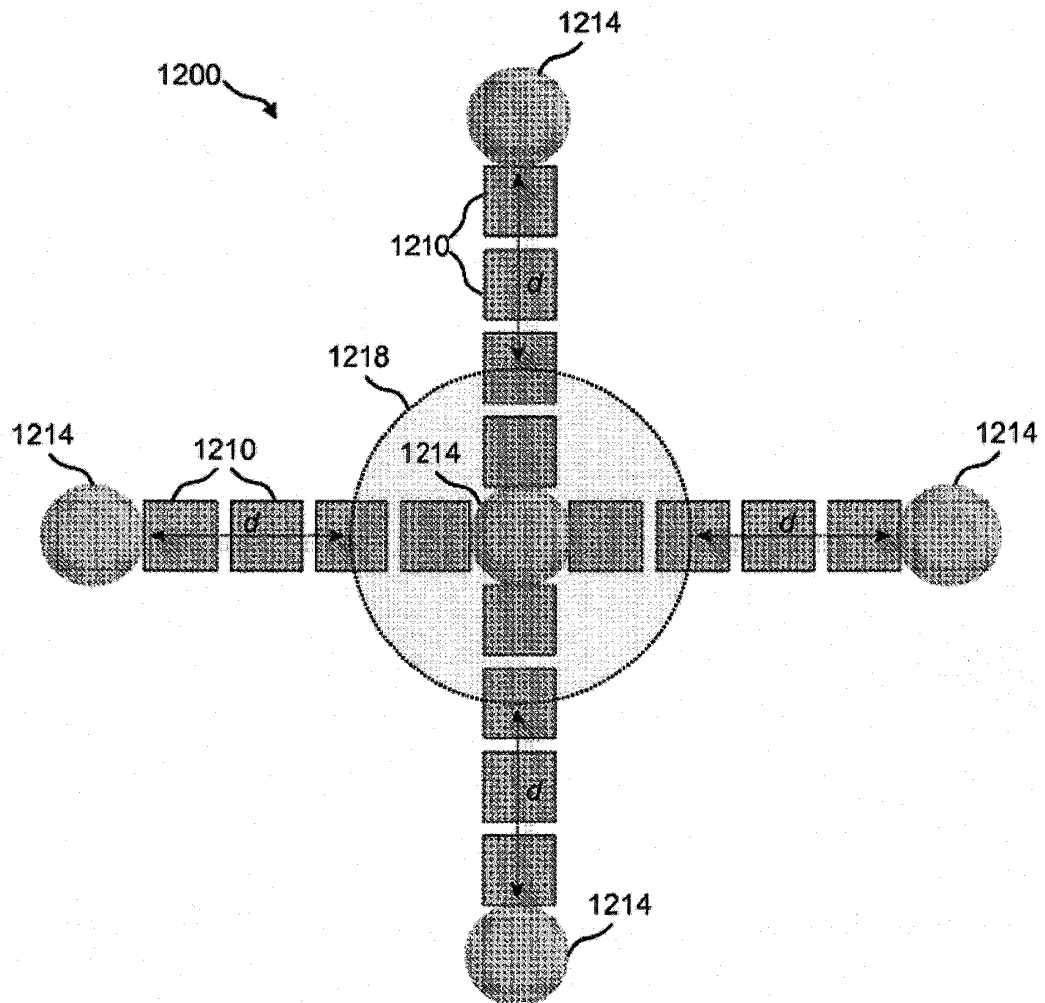
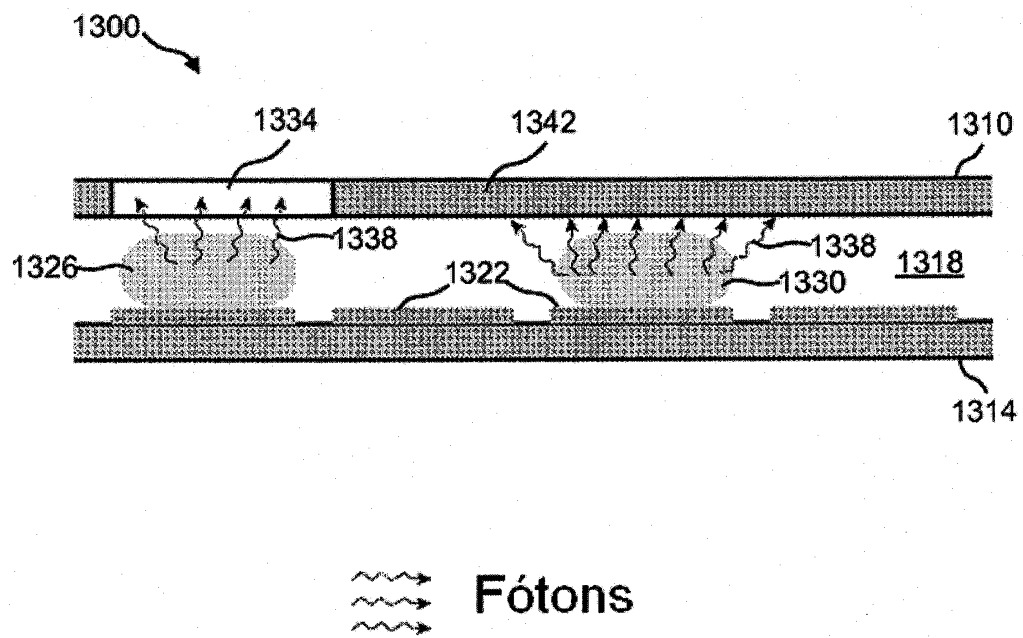


Figura 10

**Figura 11**

**Figura 12**

**Figura 13**

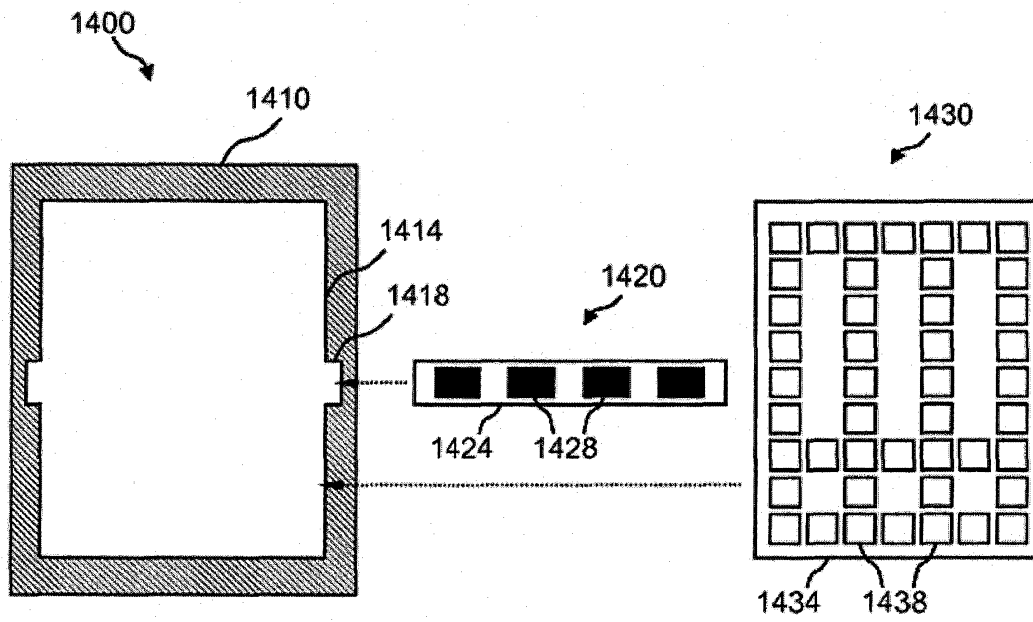


Figura 14A

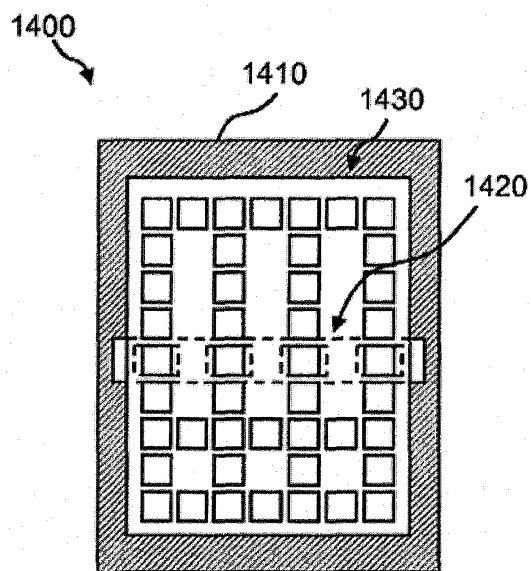
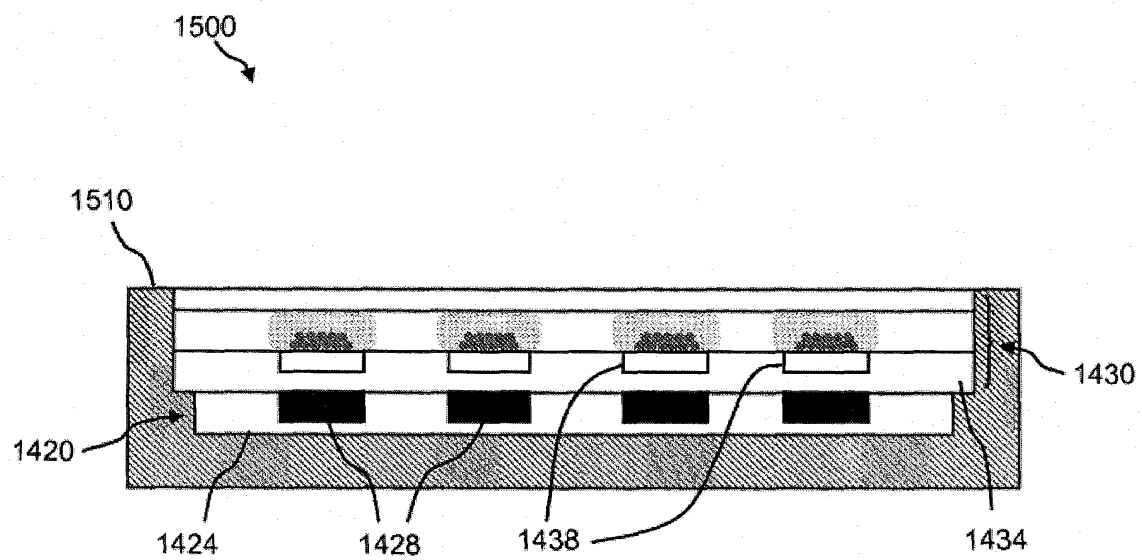


Figura 14B

**Figura 15**