

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2016/067202 A1

(43) Data de Publicação Internacional
6 de Maio de 2016 (06.05.2016)

W I P O I P C T

- (51) **Classificação Internacional de Patentes :**
G01N 15/14 (2006.01)
- (21) **Número do Pedido Internacional :**
PCT/IB2015/058284
- (22) **Data do Depósito Internacional :**
27 de Outubro de 2015 (27.10.2015)
- (25) **Língua de Depósito Internacional :** Português
- (26) **Língua de Publicação :** Português
- (30) **Dados Relativos à Prioridade :**
108002 27 de Outubro de 2014 (27.10.2014) PT
- (71) **Requerente :** UNIVERSIDADE DE AVEIRO [PT/PT]; Campus Universitário de Santiago, P-3810-193 Aveiro (PT).
- (72) **Inventores :** MENDES OLIVEIRA E SILVA, Miguel Augusto; R. Da Brejeira, 47são Bernardo, P-3810-070 Aveiro (PT). ESCADAS RAMOS MARTINS, Rui Manuel; R. Prof. Dias Afonso, 170, P-4500-091 Espinho (PT). MORTÁGUA VELHO DA MAIA SOARES, Amadeu; Rua Das Cavadas, 75bom Sucesso, P-3810-413 Aveiro (PT). NOGUEIRA DE ABREU, Sizenando; Praceta Molhe Sul, 7 1ºdirbarra, P-3830-760 Gafanha da Nazaré (PT).
- (74) **Mandatário :** SILVESTRE ALMEIDA FERREIRA, Luis Humberto; PATENTREE, Edifício Net, Rua de Salazares 842, 4149-002 Porto (PT).
- (81) **Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) :** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) :** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(Continua na página seguinte)

- (54) **Title :** EQUIPMENT FOR THE CHROMATIC DISCRIMINATION AND COUNTING OF ORGANISMS
- (54) **Título :** EQUIPAMENTO PARA DISCRIMINAÇÃO CROMÁTICA E CONTAGEM DE ORGANISMOS

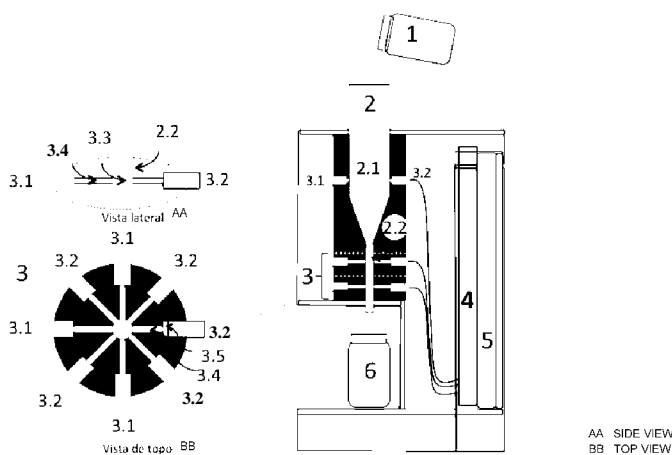


Fig. 1

(57) **Abstract :** The present disclosure relates to a device for the chromatic discrimination and counting of organisms in a liquid médium that can be used for organisms in the genera *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, *Artemia*, as well as *Collembola* and similar organisms. The device can be used in the domain of ecotoxicology and involves technologies in the fields of analytical instrumentation, electronics, information technology and biology. The device for the chromatic discrimination and counting of organisms in a sample in a liquid médium comprises a channel for ducting the sample, in which the channel has an internal section that causes the organisms to be ducted sequentially one by one along the channel, a collector to bring the sample to said channel, a light emitter to emit a chromatic signal into said channel, a light receiver to capture the chromatic signal of the organism present in said channel, and an electronic data processor configured to distinguish between the organisms counted as a function of the color of the chromatic signal received.

(57) **Resumo :**

(Continua na página seguinte)



WO 2016/067202 A1

Publicado:

— com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))

— antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de receção de tais modificações (Regra 48.2(h))

A presente divulgação diz respeito a um dispositivo para a discriminação cromática e contagem de organismos em meio líquido com aplicação, a organismos dos géneros *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, *Artemia*, bem como a *Collembola*; ou organismos similares. O dispositivo pode ser aplicado no domínio da ecotoxicologia e envolve tecnologias nas áreas da instrumentação analítica, eletrônica, informática e biologia. O dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de uma amostra em meio líquido compreende: um canal para conduzir a amostra, em que o canal tem uma seção interna de tal forma que os organismos são conduzidos sequencialmente um-a-um pelo canal; um coletor para conduzir a amostra para o referido canal; um emissor de luz para emitir um sinal cromático para o referido canal; um receptor de luz para captar o sinal cromático do organismo presente no referido canal; um processador eletrônico de dados configurado para diferenciar os organismos contados consoante a cor do sinal cromático recebido.

D E S C R I Ç Ã O

EQUIPAMENTO PARA DISCRIMINAÇÃO CROMÁTICA E CONTAGEM DE ORGANISMOS

Domínio técnico

[0001] A presente divulgação diz respeito a um dispositivo para a discriminação cromática e contagem de organismos em meio líquido com aplicação, mas não limitado, a organismos dos géneros *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, *Artemia*, **bem como a Coíemboia; ou outros organismos similares.**

[0002] A presente divulgação pode ser aplicada no domínio da ecotoxicologia e envolve tecnologias nas áreas da instrumentação analítica, eletrónica, informática e biologia.

Antecedentes

[0003] Um dos mais populares ensaios biológicos usados internacionalmente para avaliar a toxicidade crónica de compostos químicos e para monitorizar efluentes é o teste de reprodução de organismos das espécies do género *Daphnia*, particularmente *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* e *Daphnia similis*, bem como do género *Ceriodaphnia*. Alguns testes usam também a contagem de ovos de peixe como critério de avaliação.

[0004] Atualmente a contagem da descendência destes organismos é feita a "olho nu" e em contraluz portécnicos que contam os organismos à medida que os vão removendo, um a um, do meio líquido até não restar nenhum. Este processo tem de ser repetido para os diferentes tratamentos - por exemplo diferentes concentrações de composto químico ou efluente - e para as várias réplicas de cada tratamento. Assim, este procedimento é muito moroso, sujeito a erro humano e representa um risco para a

saúde do técnico, já que obriga a um esforço visual acrescido e uma prolongada exposição por contacto ou inalação a eventuais contaminantes presentes no meio.

[0005] A caracterização cromática raramente é utilizada em testes de ecotoxicologia, quer de exposição aguda, quer de reprodução, por se tratar de uma medida subjetiva e/ou muito morosa. Esta caracterização pode ser feita a olho nu, sendo realizada em simultâneo com a contagem dos organismos, o que a torna subjetiva, sujeita a erro humano e morosa. Em alternativa, pode ser realizada mediante fotografia de cada organismo, com parando visualmente a intensidade de pigmentação com uma escala de cinzentos. No entanto, este método é bastante demorado e está igualmente sujeito a erro humano. Saliente-se que a caracterização cromática pode ser um parâmetro de resposta dos organismos bastante sensível. Por exemplo, nos ensaios de reprodução, *Daphnia* sp. expostas a diferentes concentrações de um determinado composto químico podem produzir um número similar de descendentes mas exibindo padrões cromáticos diferentes. Do mesmo modo, por exemplo em ensaios de exposição aguda, *Daphnia* sp. expostas a diferentes concentrações de um determinado composto químico podem estar vivas mas apresentar padrões cromáticos diferentes. A avaliação cromática pode também indicar diferentes níveis de ingestão de alimento, por exemplo em resposta a diferentes níveis de oxigénio dissolvido na água.

[0006] Adicionalmente, este dispositivo permite a avaliação da ingestão em organismos, nomeadamente *Daphnia* sp. e *Ceriodaphnia* sp., expostos a compostos químicos ou efluentes contaminados. Esta avaliação é realizada através da caracterização cromática do meio em que estes organismos se encontram, em dois momentos temporais distintos.

[0007] Estes documentos ilustram o problema técnico a resolver pela presente solução.

Descrição Geral

[0008] A presente divulgação diz respeito a um dispositivo com aplicação em testes de ecotoxicologia para contagem automática e caracterização cromática de organismos em

meio líquido, permitindo a diferenciação entre os organismos e eventuais artefactos - como sejam mudas de *Daphnia* ou outras partículas - ou permitindo a diferenciação entre diferentes organismos ou entre diferentes estádios de desenvolvimento do mesmo organismo, através de diferentes características cromáticas - como por exemplo ovos de peixe fertilizados/não fertilizados. Este dispositivo efetua uma contagem total dos organismos, contagem individualizada e não probabilística, e permite uma caracterização cromática dos organismos ou partículas, estabelecendo padrões cromáticos para o reconhecimento desses grupos, mediante análise e processamento de sinal.

[0009] As presentes realizações são úteis para contar os organismos distinguindo os organismos dos não-organismos consoante a característica do sinal cromático recebido, nomeadamente diferenciando os organismos *Daphnia* em relação às respetivas mudas, ou por exemplo, diferenciando ovos de peixes fertilizados de ovos não fertilizados. Com as várias realizações da presente invenção, além da caracterização da amostra, efetua-se a contagem presencial de todos os organismos, com a eliminação dos falsos positivos, e com uma caracterização cromática de todos os organismos presentes. Em testes de ecotoxicologia, todos os organismos em exposição contam para os resultados finais da exposição e o equipamento efetua a contagem total e presencial desses organismos, um a um, e não mediante uma avaliação estatística ou probabilística da sua distribuição e número.

[0010] Na presente divulgação considera-se que os principais organismos são espécimes de *Daphnia* sp., *Ceriodaphnia* sp., *Coilemboía*, *Artemia*, mas podem ser utilizados outros organismos crustáceos, plâncton, cnidários, ovos de peixe, ovos de anfíbios ou mesmo ovos de répteis entre outros.

[0011] A presente divulgação descreve um dispositivo de contagem e caracterização cromática de organismos, com particular interesse em ensaios de ecotoxicologia com a utilização dos organismos referidos na presente divulgação, mas pode ser também utilizado para contagem e caracterização cromática de outros organismos em suspensão e com dimensões similares.

[0012] Um dos aspetos da presente divulgação descreve um dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de uma amostra em meio líquido, que compreende:

um canal para conduzir a amostra, em que o canal tem uma secção interna de tal forma que os organismos são conduzidos sequencialmente um-a-um pelo canal;

um coletor para conduzir a amostra para o referido canal;

um emissor de luz para emitir um sinal cromático para o referido canal;

um recetor de luz para captar o sinal cromático do organismo presente no referido canal;

um processador eletrónico de dados configurado para diferenciar os organismos contados consoante a cor do sinal cromático recebido.

[0013] Numa realização o dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos pode compreender um canal tubular, de preferência um estilete.

[0014] Numa realização o coletor do dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos o coletor pode ser um funil.

[0015] Numa realização o coletor do dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos o coletor pode estar colocado relativamente ao canal de tal forma que a condução da amostra seja por gravidade.

[0016] Numa realização do dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos o sinal cromático presente no referido canal é o sinal cromático refletido, absorvido, refratado e/ou auto-emitido pelo organismo.

[0017] Numa realização do dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos o recetor de luz pode estar colocado a 180° do emissor para captar o sinal cromático de transmitância do organismo presente no referido canal.

[0018] Numa realização do dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos o recetor de luz pode estar colocado a um ângulo inferior a 180° do emissor

para captar o sinal cromático de reflexão, refração e/ou auto-emissão do organismo presente no referido canal.

[0019] Numa realização do dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos o emissor e o recetor de luz estão compreendidos num conjunto ótico acoplado na secção transversal do referido canal.

[0020] Numa realização do dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos o componente ótico pode compreender fibra ótica, lente ou filtro para filtragem cromática para evidenciar a distinção entre a cor do sinal cromático recebido de organismo e de não-organismo, em particular sendo a filtragem cromática um filtro de cor verde.

[0021] Numa realização do dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos pode compreender um segundo emissor de luz e um segundo recetor de luz para caracterização cromática do meio da amostra.

[0022] Numa realização do dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos o segundo emissor de luz e o segundo recetor de luz podem estar dispostos a montante do primeiro emissor de luz e do primeiro recetor de luz.

[0023] Numa realização o dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos pode compreender ainda um ecrã ou mostrador integrado para visualização da contagem.

[0024] Numa realização o dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos pode compreender ainda uma ligação de dados para enviar os dados da contagem.

[0025] Outro aspeto da presente divulgação compreende um sistema compreender dois ou mais dispositivos de discriminação cromática e contagem de organismos descrito na presente divulgação em que os dispositivos estão acoplados em paralelo para processamento simultâneo de amostras, ou acoplados em série para

processamento sequencial de amostras com diferentes características, ou acoplados em combinação série-paralelo.

[0026] Numa realização o dispositivo é composto por: uma componente de serialização (2), uma componente ótica (3), uma componente eletrónica (4) e uma componente computacional (5).

[0027] Numa realização do dispositivo, a componente de serialização serializa a totalidade dos organismos em suspensão no meio líquido por intermédio de um dispositivo de afunilamento (2.1) e escoamento por gravidade do líquido, ao longo de um estilete (2.2) de secção interna adaptada às dimensões do organismo.

[0028] Numa realização do dispositivo, a componente ótica é composta por um ou mais emissores de luz (3.1) e por um ou mais recetores de luz (3.2), distribuídos radialmente em torno de uma janela ótica (3.3) situada numa secção transversal do estilete, e garantindo a interceção dos feixes óticos por todos os organismos. A captação do sinal é feita medindo a transmitância da luz em recetores colocados a 180° dos emissores, e/ou medindo a reflexão, refração e/ou emissão em recetores colocados a um ângulo inferior a 180° dos emissores. A disposição radial dos feixes óticos permite não apenas redundância na contagem e/ou caracterização cromática no mesmo plano espacial e instante temporal, mas também, ao intercectar o organismo em diferentes ângulos, minimizar eventuais problemas de morfologias assimétricas dos organismos, como por exemplo em *Daphnia magna*.

[0029] Numa realização do dispositivo, a componente eletrónica (4) é responsável pelo condicionamento dos sinais elétricos recebidos nos recetores e subsequente conversão analógico-digital.

[0030] Numa realização do dispositivo, a componente computacional (5) é responsável pelo processamento dos sinais digitais para contagem automática e caracterização cromática individualizada de todos os organismos.

[0031] Uma possível forma de realização permite a adaptação às características cromáticas dos organismos a avaliar, mediante seleção das características cromáticas dos emissores de luz, e/ou mediante seleção das características cromáticas dos recetores de luz, e/ou mediante colocação de filtros óticos no feixe ótico.

[0032] Outra possível forma de realização inclui várias componentes óticas dispostas em diferentes níveis do estilete da componente de serialização, o que possibilita redundância na contagem e/ou caracterização cromática melhorando dessa forma a precisão do dispositivo.

[0033] Outra possível forma de realização utiliza fibras óticas no dueto do componente ótico (3.4) para condução e eventual filtragem do sinal ótico para os detetores (3.2).

[0034] Outra possível forma de realização é caracterizada por o componente ótico recorrer a lentes (3.5) para condicionamento do feixe ótico de forma a melhorar o sinal ótico e/ou maximizar o rendimento dos detetores de luz.

[0035] Outra possível forma de realização é caracterizada por ter emissores e recetores aplicados na parte superior do recipiente coletor (2.1), permitindo a caracterização cromática do meio em simultâneo com a contagem e caracterização cromática dos organismos. Esta funcionalidade possibilita a realização da caracterização cromática do meio em simultâneo com a contagem e caracterização cromática dos organismos. Esta funcionalidade, por exemplo como medida indireta da concentração de algas no meio, é particularmente útil em ensaios ecotoxicológicos para avaliação da ingestão.

[0036] Outra possível forma de realização é caracterizada pela apresentação em tempo real dos resultados.

[0037] Outra possível forma de realização é caracterizada pela visualização dos resultados no próprio dispositivo recorrendo a displays de sete segmentos ou outro visualizador simples que pode fazer parte do próprio dispositivo.

[0038] Outra possível forma de realização é caracterizada pelo envio dos resultados para um sistema computacional de apoio permitindo o seu armazenamento remoto e/ou outro processamento sobre estes resultados.

[0039] Outra possível forma de realização é caracterizada pela replicação em paralelo de cada dispositivo unitário de contagem e caracterização cromática, permitindo reduzir o tempo de processamento para múltiplas réplicas e/ou permitir o processamento simultâneo de amostras com diferentes características, como por exemplo diferentes concentrações.

[0040] O dispositivo permite a reproprocessamento da mesma amostra, as vezes que for necessário, mediante recolha e reposição da amostra em estudo.

[0041] Ao longo da descrição e reivindicações a palavra "compreende" e variações da palavra, não têm intenções de excluir outras características técnicas, componentes, ou passos. Objetos adicionais, vantagens e características da invenção irão tornar-se evidentes para os peritos na técnica após o exame da descrição ou podem ser aprendidos pela prática da invenção. Os seguintes exemplos e figuras são fornecidos como forma de ilustração, e não têm a intenção de serem limitativos da presente invenção. Além disso, a presente invenção abrange todas as possíveis combinações de formas de realização particulares ou preferenciais aqui descritas.

Breve descrição das figuras

[0042] Para uma mais fácil compreensão da solução juntam-se em anexo as figuras, as quais, representam realizações preferenciais do invento que, contudo, não pretendem limitar o objeto da presente divulgação.

[0043] **Figura 1** - Representação esquemática de uma forma de realização do dispositivo, exemplificando uma concretização das reivindicações 1 a 9, seguindo-se uma descrição detalhada do significado das partes constituintes enumeradas.

[0044] **Figura 2** - Representação de uma realização para múltiplas contagens e caracterizações cromáticas de várias réplicas, procedimento comum em testes de ecotoxicologia.

[0045] **Figura 3** - Representação esquemática de um diagrama com a forma de realização singular do equipamento de contagem.

[0046] **Figura 4** - Representação esquemática de uma forma de realização composta por 2 ou mais dispositivos de contagem ligados a uma única unidade de processamento.

[0047] Em ecotoxicologia, a realização de ensaios de reprodução com organismos modelo, ex. *Daphnia sp.*, exige a contagem do número total de organismos em diversos replicados, para avaliação dos diversos índices de toxicidade. Atualmente a contagem é efectuada por técnicos mediante observação direta dos organismos expostos em contraluz. No entanto, este processo de contagem a "olho nu" é lento, cansativo e sujeito a erro humano, para além de poder ter efeitos nefastos na acuidade visual do pessoal técnico envolvido na contagem. A presente divulgação automatiza este processo de contagem com ganhos em termos de tempo de execução e precisão de contagem, além de também permitir a caracterização cromática dos organismos.

[0048] O dispositivo é dirigido para a contagem e caracterização cromática de organismos de reduzidas dimensões em suspensão, em particular *Daphnia sp.*, *Ceriodaphnia*, *Artemia* ou ovos de peixe, permitindo a diferenciação entre o tipo específico de organismos a contar e eventuais artefactos recorrendo a diferentes características cromáticas. Adicionalmente, este dispositivo permite a avaliação da ingestão, por exemplo considerando testes com *Daphnia* ou *Ceriodaphnia*, através da caracterização cromática do meio em que estes organismos se encontram.

[0049] Numa realização, o amostrador (1) de organismos em suspensão num líquido. O recipiente na figura é apenas ilustrativo de uma possível realização podendo o líquido provir de outro aparelho, como, por exemplo, através de tubagens.

[0050] Numa realização, o componente de serialização de todos os organismos presentes, composta por um segmento coletor da amostra na secção superior (2.1), com uma funcionalidade tipo funil; e um segmento cilíndrico, estilete, na secção inferior (2.2), com diâmetro interno adaptado à dimensão dos organismos. A componente de serialização, ou parte dela, está inserida numa câmara escura para eliminar interferências luminosas do exterior.

[0051] Numa realização, a componente ótica composta por um ou mais emissores de luz (3.1) e por um ou mais recetores de luz (3.2), distribuídos radialmente em torno de uma janela ótica (3.3) através de duetos (3.4) para passagem do feixe ótico e que podem conter fibra ótica. A componente ótica pode também incluir lentes ou filtros óticos (3.5) colocados imediatamente após os emissores de luz e/ou antes dos recetores de luz. A emissão de luz é ajustável, eventualmente com espectro adaptado às características do tipo de organismo a contar, garantindo um contraste mínimo entre os organismos e o meio líquido envolvente.

[0052] Numa realização, a componente eletrónica, para condicionamento dos sinais elétricos recebidos nos recetores e subsequente conversão analógico-digital.

[0053] Componente computacional, portátil ou outro, de contagem e/ou caracterização cromática dos organismos, podendo também registar outra informação considerada relevante como a data, localização, temperatura, etc.

[0054] Coletor dos organismos e da solução, podendo ser um recipiente, como ilustrado na figura, ou outro aparelho

[0055] Esta forma de realização tem as seguintes partes constituintes:

- Replicação das componentes de serialização;
- Componente eletrónica partilhada;
- Componente computacional partilhada.

[0056] Uma aplicação para este dispositivo pode ser em estudos de ecotoxicologia com organismos *Daphnia*, em particular na contagem de neonatos como estipulado na norma OECD número 221, mas pode ser aplicada na contagem e caracterização cromática de outros organismos.

[0057] O processo é realizado com a serialização de todos os organismos presente, recorrendo a um dispositivo, simultaneamente leve, pouco volumoso, e de grande portabilidade. O dispositivo permite substituir o atual processo a "olho nu" de contagem de organismos, nomeadamente *Daphnia*, em testes de ecotoxicologia. O dispositivo utiliza um sistema automático de elevada fiabilidade, minimizando a duração da contagem, afastando o erro humano e possíveis consequências para a saúde dos técnicos. Para além disso, uma possível forma de realização deste dispositivo permite uma adaptação cromática ao meio ou a cada tipo de organismo, minimizando possíveis erros de contagem. Adicionalmente, a caracterização cromática do meio pode ser utilizada como um parâmetro de avaliação da assimilação dos organismos, particularmente útil em testes de ingestão. Independentemente dessa possibilidade, neste sistema a contagem e repetição da contagem é um processo simples e rápido.

[0058] Dada a simplicidade do dispositivo, este pode também ser utilizados para procedimentos de contagem automática de outros organismos, tais como *Ceriodaphnia* e *Artemia*, e também ovos de peixes diferenciando ovos fecundados de ovos não fecundados. Em adição à contagem de organismos aquáticos, este dispositivo pode ser usado para contar outros organismos desde que os mesmos sejam colocados em suspensão, como por exemplo organismos do género *Collembola*.

[0059] Adicionalmente, a caracterização cromática pode ser utilizada para avaliação da coloração dos organismos, um indicador do seu estado de saúde. Com a caracterização cromática, este indicador pode ser traduzido por um parâmetro quantitativo digital e que descreveria quantitativamente a alteração do estado de saúde resultante da exposição a compostos químicos ou determinados fatores ambientais.

[0060] Este dispositivo permite ainda a avaliação das taxas de ingestão, por exemplo em testes com *Daphnia* e *Ceriodaphnia*, através da caracterização cromática do meio em que estes dafnídeos se encontram em dois momentos temporais distintos.

Descrição da contagem de *Daphnia* numa amostra com *Daphnia* e mudas de *Daphnia* utilizando o dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos da presente divulgação

[0061] Para a contagem de neonatos de *Daphnia*, a solução com os organismos é colocada no coletor da unidade de serialização, sendo os organismos serializados e direcionados de modo a interceptar os feixes na componente óptica, gerando assim um sinal próprio que será condicionado e enviado para a unidade computacional para processamento e apuramento do resultado. A contagem total, um número normalmente entre 0 e 60 indivíduos por solução de 100mL, é obtida em cerca de 60 segundos; no entanto, o número de contagens a realizar por teste pode ascender às centenas. No início de cada sessão deve ser feita uma calibração com o conjunto de organismos em teste para que o equipamento seja calibrado de acordo com os organismos - neonatos de *Daphnia* e mudas de neonatos de *Daphnia* - que vai receber. O sinal cromático individual produzido por cada um dos elementos do grupo dos neonatos apresenta um padrão similar intra-grupo mas diferente e distinto do padrão individual apresentado pelos elementos do outro grupo das mudas, e é com base nessa diferenciação cromática que a unidade computacional vai discernir o grupo a que pertence cada um dos elementos ou itens analisado na componente óptica, e incrementar - unidade a unidade - ou um ou o outro grupo em análise, e de acordo com o padrão cromático produzido por esse elemento. Em trabalhos de rotina poderá ser utilizada uma calibração de "fábrica" fornecida com o equipamento.

Descrição da contagem de ovos de peixe fertilizado e não fertilizados utilizando o dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos da presente divulgação

[0062] Numa realização, para a contagem de ovos de peixes, fertilizados e não fertilizados, colocam-se os ovos, em cerca de 100ml de solução aquosa, ou outra, sendo posteriormente colocados no coletor da unidade de serialização, e seguindo-se o processo descrito na alínea anterior. No início de cada sessão deve ser feita uma calibração com três conjuntos de ovos; por exemplo, procedendo à aquisição de um padrão com 50 ovos fertilizados, outro padrão com 50 ovos não fertilizados, assim como de uma mistura, por exemplo, com 50 ovos fertilizados + 50 ovos não fertilizados, como medida de avaliação do equipamento. A contagem indica o número total de ovos, o número total de ovos fecundados e o número total de ovos não fecundados, podendo ainda indicar um número de ovos cuja classificação foi inconclusiva.

[0063] O termo "compreende" ou "compreendendo" quando utilizado neste documento destina-se a indicar a presença das características, elementos, inteiros, passos e componentes mencionados, mas não impede a presença ou a adição de uma ou mais outras características, elementos, inteiros, passos e componentes, ou grupos dos mesmos.

[0064] As realizações atrás descritas são combináveis entre si.

[0065] A presente invenção não é, naturalmente, de modo algum restrita às realizações descritas neste documento e uma pessoa com conhecimentos médios da área poderá prever muitas possibilidades de modificação da mesma e de substituições de características técnicas por outras equivalentes, dependendo dos requisitos de cada situação, tal como definido nas reivindicações anexas.

[0066] As seguintes reivindicações definem adicionalmente realizações preferenciais.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de uma amostra em meio líquido, que compreende:
um canal para conduzir a amostra, em que o canal tem uma secção interna de tal forma que os organismos são conduzidos sequencialmente um-a-um pelo canal;
um coletor para conduzir a amostra para o referido canal;
um emissor de luz para emitir um sinal cromático para o referido canal;
um recetor de luz para captar o sinal cromático do organismo presente no referido canal;
um processador eletrónico de dados configurado para diferenciar os organismos contados consoante a cor do sinal cromático recebido.
2. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com a reivindicação anterior em que o canal é tubular, de preferência um estilete.
3. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com as reivindicações anteriores em que o coletor é um funil.
4. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com as reivindicações anteriores em que o coletor está colocado relativamente ao canal de tal forma que a condução da amostra seja por gravidade.
5. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com as reivindicações anteriores em que o sinal cromático presente no referido canal é o sinal cromático refletido, absorvido, refratado e/ou auto-emitido pelo organismo.
6. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com as reivindicações anteriores em que o recetor de luz está colocado a 180° do emissor para captar o sinal cromático de transmitância do organismo presente no referido canal.
7. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com as reivindicações anteriores em que o recetor de luz está colocado a um ângulo

- inferior a 180° do emissor para captar o sinal cromático de reflexão, refração e/ou auto-emissão do organismo presente no referido canal.
8. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com as reivindicações anteriores em que o emissor e o recetor de luz estão compreendidos num conjunto ótico acoplado na secção transversal do referido canal.
 9. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com as reivindicações anteriores em que o componente ótico compreende fibra ótica, lente ou filtro para filtragem cromática para evidenciar a distinção entre a cor do sinal cromático recebido de organismo e de não-organismo, em particular sendo a filtragem cromática um filtro de cor verde.
 10. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com as reivindicações anteriores que compreende um segundo emissor de luz e um segundo recetor de luz para caracterização cromática do meio da amostra.
 11. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com a reivindicação anterior em que o segundo emissor de luz e o segundo recetor de luz estão dispostos a montante do primeiro emissor de luz e do primeiro recetor de luz.
 12. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com as reivindicações anteriores que compreende um ecrã ou mostrador integrado para visualização da contagem.
 13. Dispositivo para discriminação cromática e contagem de organismos de acordo com as reivindicações anteriores que compreende uma ligação de dados para enviar os dados da contagem.
 14. Sistema que compreende dois ou mais dispositivos para discriminação e contagem de organismos de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que os dispositivos estão acoplados em paralelo para processamento simultâneo de amostras, ou acoplados em série para processamento sequencial de amostras com diferentes características, ou acoplados em combinação série-paralelo.

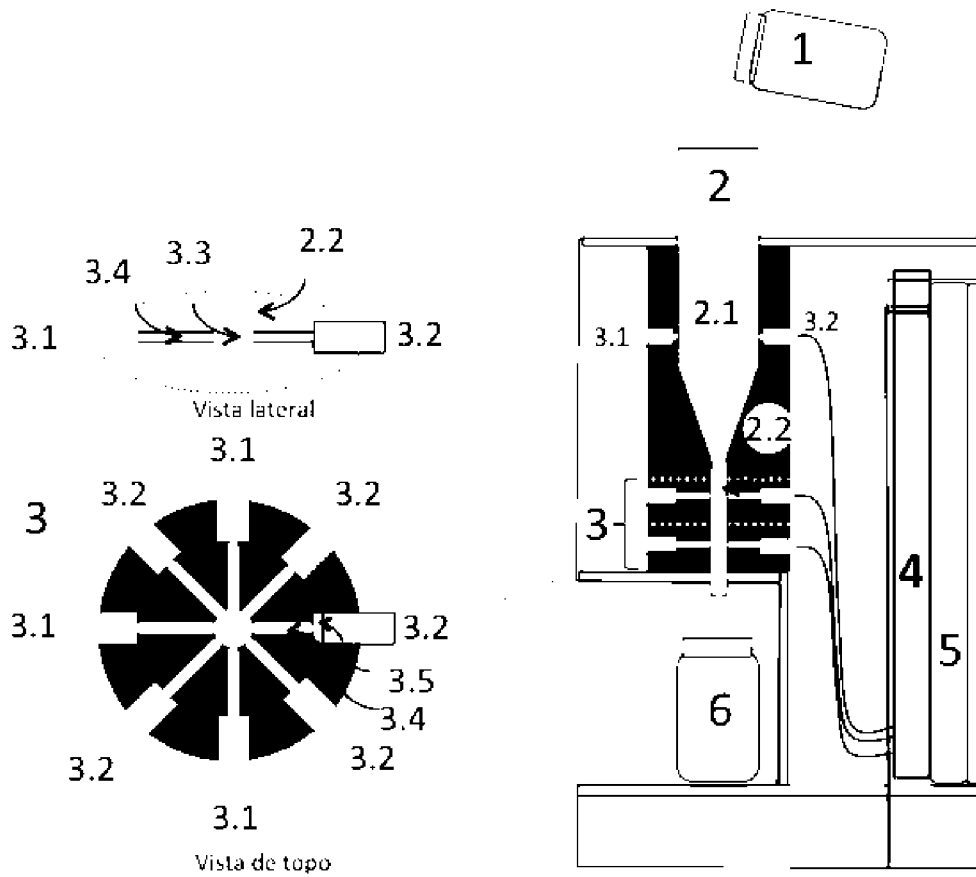


Fig. 1

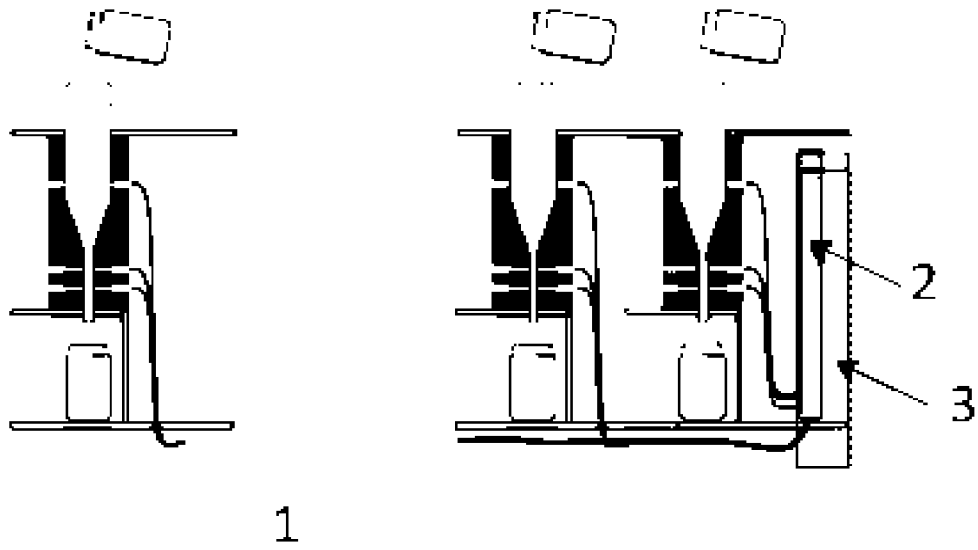


Fig. 2

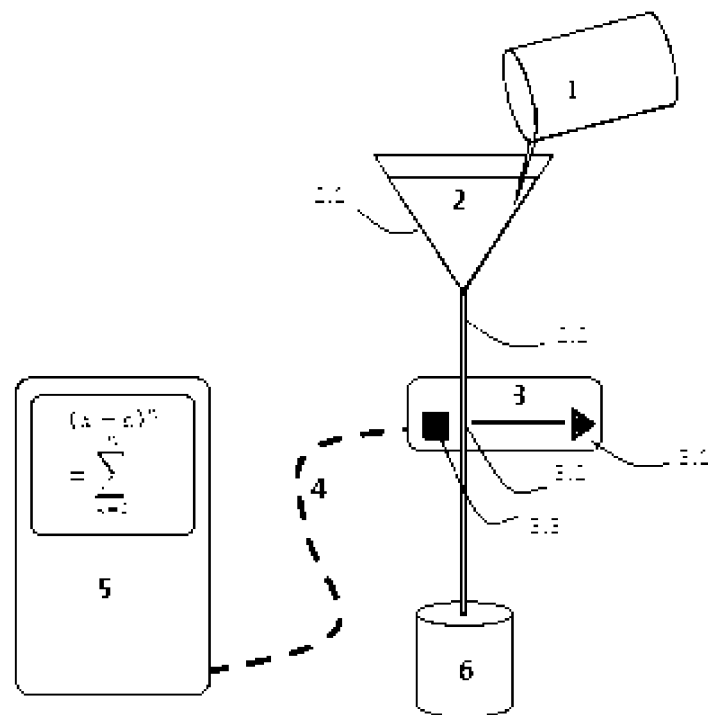


Fig. 3

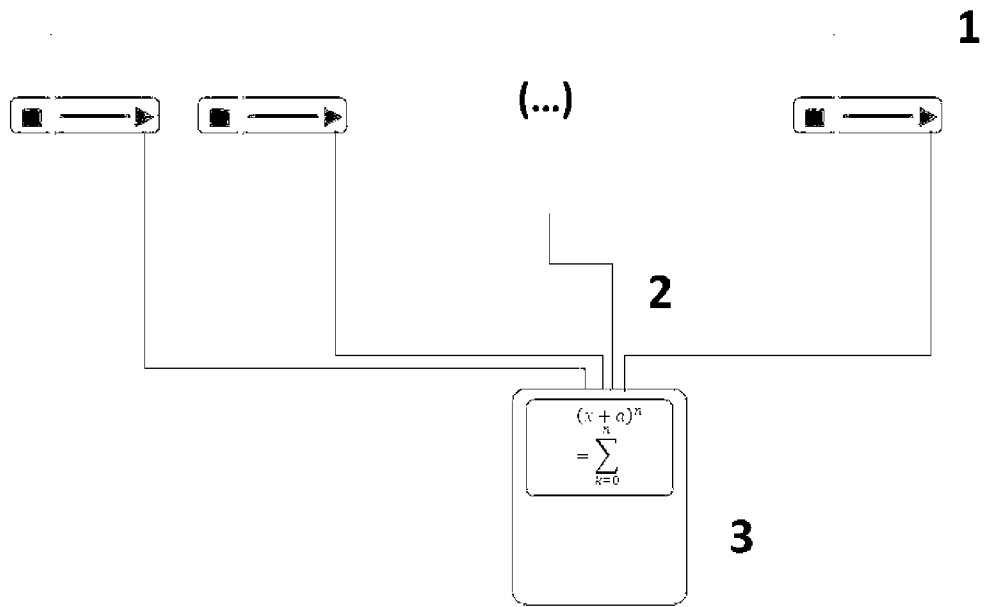


Fig. 4

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

G01N15/14

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

G01N

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPO-Internal , WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
X	US 2004/021868 A1 (ORTYN WILLIAM E [US] ET AL) 5 Fevereiro 2004 (2004-02.05)	1, 2, 5-8, 11, 13, 14
Y	Resumo Figuras 1, 3, 5, 14 Parágrafos [0066], [0078], [01 05]	4

X	US 2004/125371 A1 (CHANG RICHARD [US] ET AL) 1 Julho 2004 (2004-07-01)	1, 9, 10, 12
	Resumo Figuras 1, 7 Parágrafos [0004], [0022], [0042], [0056]	

X	US 2002/033939 A1 (HANSEN W PETER [US]) 21 Março 2002 (2002-03-21)	1, 3
	Resumo Figura 2a Parágrafos [001 9], [0063]	

 Documentos adicionais estão listados na continuação do Quadro C Ver o anexo de família da patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.	"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.
"E" depósito ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional.	"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.
"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial (como especificado).	"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.
"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.	"&" documento membro da mesma família de patentes.
"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.	

Data da conclusão da pesquisa internacional

11 Fevereiro 2016 (11.02.2016)

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

22 Fevereiro 2016 (22.02.2016) ;

Nome e endereço da ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

N° de fax:

Funcionário autorizado

Seifter, Achim

N° de telefone:

Categoria*	Citação do documento com indicação de partes relevantes, quando apropriado	Relevante para as reivindicações N°
X	US 2013/334407 A1 (PERRAULT JR DONALD FRANCIS [US] ET AL) 19 Dezembro 2013 (2013-12-19) Resumo Figuras 4, 5 Parágrafos [0003], [0028], [0084], [0099]	1
Y	----- W0 2014/144789 A2 (FLUIDIGM CORP [US]) 18 Setembro 2014 (2014-09-18) Parágrafo [021 1] -----	4

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
 Informação relativa a membros cia família da patentes

Depósito internacional Nº

PCT/IB2015/058284

US 2004021868	A1	05-02-2004	US 2004021868	A1	05-02-2004
			US 2006066837	A1	30-03-2006

US 2004125371	A1	01-07-2004	NENHUM		

US 2002033939	A1	21-03-2002	AT 376175	T	15-11-2007
			AU 754644	B2	21-11-2002
			AU 5576499	A	14-03-2000
			CA 2341231	A1	02-03-2000
			DE 69937353	T2	17-07-2008
			EP 1105713	A1	13-06-2001
			JP 2002523738	A	30-07-2002
			MX PA01001826	A	08-04-2002
			US 6400453	BI	04-06-2002
			US 2002033939	A1	21-03-2002
			WO 0011449	A1	02-03-2000

US 2013334407	A1	19-12-2013	NENHUM		

Wo 2014144789	A2	18-09-2014	CA 2895638	A1	18-09-2014
			CN 105164246	A	16-12-2015
			EP 2970849	A2	20-01-2016
			SG 11201504876T	A	30-07-2015
			US 2016025761	A1	28-01-2016
			WO 2014144789	A2	18-09-2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2015/058284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N15/14
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal , WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y X X	<p>US 2004/021868 A1 (ORTYN WILLIAM E [US] ET AL) 5 February 2004 (2004-02-05) abstract figures 1, 3, 5, 14 paragraphs [0066], [0078], [0105] -----</p> <p>US 2004/125371 A1 (CHANG RICHARD [US] ET AL) 1 July 2004 (2004-07-01) abstract figures 1, 7 paragraphs [0004] - [0022], [0042] - [0056] -----</p> <p>US 2002/033939 A1 (HANSEN W PETER [US]) 21 March 2002 (2002-03-21) abstract figure 2a paragraphs [0019] - [0063] -----</p> <p style="text-align: center;">-/- .</p>	<p>I, 2, 5-8, II, 13, 14 4</p> <p>1, 9, 10, 12</p> <p>1, 3</p>

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the International filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report
11 February 2016	22/02/2016

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Seiffter, Achim
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2015/058284

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/334407 A1 (PERRAULT JR DONALD FRANCIS [US] ET AL) 19 December 2013 (2013-12-19) abstract figures 4, 5 paragraphs [0003] - [0028], [0084] - [0099] -----	1
Y	W0 2014/144789 A2 (FLUIDIGM CORP [US]) 18 September 2014 (2014-09-18) paragraph [0211] -----	4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/058284

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004021868 A1	05-02-2004	US 2004021868 A1 US 2006066837 A1	05-02-2004 30-03-2006

US 2004125371 A1	01-07-2004	NONE	

US 2002033939 A1	21-03-2002	AT 376175 T AU 754644 B2 AU 5576499 A CA 2341231 A1 DE 69937353 T2 EP 1105713 A1 JP 2002523738 A MX PA01001826 A US 6400453 BI US 2002033939 A1 WO 0011449 A1	15-11-2007 21-11-2002 14-03-2000 02-03-2000 17-07-2008 13-06-2001 30-07-2002 08-04-2002 04-06-2002 21-03-2002 02-03-2000

US 2013334407 A1	19-12-2013	NONE	

WO 2014144789 A2	18-09-2014	CA 2895638 A1 CN 105164246 A EP 2970849 A2 SG 11201504876T A US 2016025761 A1 WO 2014144789 A2	18-09-2014 16-12-2015 20-01-2016 30-07-2015 28-01-2016 18-09-2014
