



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 255 349**

② Número de solicitud: 200301500

⑤ Int. Cl.:  
**G01N 15/14** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **25.06.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2006**

Fecha de la concesión: **13.07.2007**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.08.2007**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2007**

⑰ Titular/es: **Universidad de Sevilla  
Pabellón de Brasil  
Paseo de las Delicias, s/n  
41013 Sevilla, ES**

⑱ Inventor/es: **Gañán Calvo, Alfonso;  
Chávez de Diego, Sebastián;  
Riesco Chueca, Pascual y  
Martínez Armesto, Juan**

⑳ Agente: **No consta**

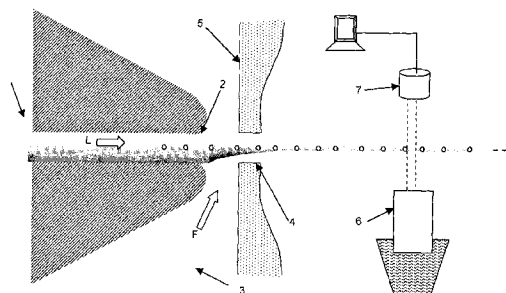
① Título: **Procedimiento y dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético.**

② Resumen:

Procedimiento y dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético.

Es objeto de la presente invención un procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, que incluye las siguientes etapas:

- impulsión mediante una sobrepresión de hasta 200 atm a través de un orificio, simultánea y concéntrica, de un líquido L portador de las unidades discretas, conjuntamente con otro fluido F inmiscible con él, que lo envuelve dando lugar a un chorro.
- ajuste del caudal del chorro a un valor comprendido entre una y trescientas veces el cuadrado de la tensión superficial correspondiente a la interfase del líquido L y el fluido envolvente F, dividida por la raíz cuadrada del producto de la densidad del líquido L y la potencia tercera del incremento de presión  $\Delta p$ ;
- ajuste del diámetro y el caudal del chorro a los requerimientos de frecuencia de paso y umbral de detección del sensor;
- registro por el sensor del paso de las unidades discretas y caracterización en sucesión de cada una de ellas.



ES 2 255 349 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético.

### Objeto de la invención

Es objeto de la presente invención un procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, que incluye las siguientes etapas:

- impulsión mediante una sobrepresión de hasta 200 atm a través de un orificio, simultánea y concéntrica, de un líquido L portador de las unidades discretas, conjuntamente con otro fluido F inmiscible con él, que lo envuelve dando lugar a un chorro.
- ajuste del caudal del chorro a un valor comprendido entre una y trescientas veces el cuadrado de la tensión superficial correspondiente a la interfase del líquido L y el fluido envolvente F, dividida por la raíz cuadrada del producto de la densidad del líquido L y la potencia tercera del incremento de presión  $\Delta p$ ;
- ajuste del diámetro y el caudal del chorro a los requerimientos de frecuencia de paso y umbral de detección del sensor;
- registro por el sensor del paso de las unidades discretas y caracterización en sucesión de cada una de ellas.

Es asimismo objeto de la presente invención un procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según lo anterior, caracterizado porque el fluido envolvente F es un gas.

Además, se define en esta invención un procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según lo anterior, caracterizado porque la viscosidad del líquido L se ajusta haciendo que éste sea producto de la mezcla de al menos dos líquidos miscibles de viscosidad diferente y compatibles con las unidades discretas en suspensión, de tal forma que la longitud del chorro capilar sea superior a 300 micrómetros, preferentemente superior a 1 milímetro, medida a partir del orificio hasta el punto donde el chorro capilar se disgrega en gotas.

Tal procedimiento se puede aplicar a la identificación y caracterización secuencial de diversos tipos de unidades discretas: células, virus, microcristales, partículas inertes, partículas-sonda con afinidad por sustancias a analizar, microcápsulas mono- o multivesiculares.

Por otra parte, el procedimiento puede incluir una etapa de separación de las unidades discretas.

Asimismo es objeto de la invención un dispositi-

vo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en uno o más chorros capilares en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, caracterizado porque incluye:

- una fuente del líquido L portador de las unidades discretas;
- una fuente del fluido F envolvente;
- una barrera impermeable, que separa a las dos fuentes citadas del ambiente exterior, y de la que emergen uno o más chorros de líquido portador L rodeados concéntricamente por el fluido envolvente F a través de uno o más orificios correspondientemente practicados en dicha barrera;
- un elemento que asegura una sobrepresión de hasta 200 atm de las fuentes con respecto al ambiente exterior y permite que todos los caudales emergentes del o de los orificios se encuentren en el rango descrito en la reivindicación 1;
- un sensor, situado ante el tramo estable del o los chorros concéntricos, que registra las unidades discretas en tránsito secuencial.

Opcionalmente, el fluido envolvente F puede ser un gas.

El dispositivo se puede aplicar a la identificación y caracterización secuencial de diversos tipos de unidades discretas: células, virus, microcristales, partículas inertes, partículas-sonda con afinidad por sustancias a analizar, microcápsulas mono- o multivesiculares.

Asimismo, puede incluir elementos para efectuar la separación de dichas unidades discretas del chorro capilar.

### Estado de la técnica

La citometría de flujo (CMF) es una tecnología destinada a medir muy diversos parámetros celulares, tales como antígenos de superficie, citoplasmáticos y nucleares, ácidos nucleicos, actividad enzimática, flujo de calcio, potencial de membrana y pH. Se caracteriza esta tecnología, desarrollada en los últimos 35 años, por su capacidad para la medición de un gran número de células, en forma individual, durante periodos muy corto de tiempo. Entre sus ventajas se encuentran su exactitud, precisión, rapidez y capacidad para procesar un gran número de muestras en corto tiempo. La CMF permite un análisis multiparamétrico, extensivo a un gran número de células y a múltiples procesos funcionales; es fácil conseguir una buena integración de respuestas y mecanismos, así como una adecuada resolución de la heterogeneidad celular y una selección fenotípica de subpoblaciones. Sin embargo, el equipo, su mantenimiento y reactivos son todavía costosos.

En CMF, las células o partículas objeto de medición se desplazan arrastradas por un flujo o torrente líquido laminar, siendo los rangos actuales de medición de 100-25.000 células por segundo en sangre periférica u otros líquidos corporales. Cada célula pasa por un punto donde el chorro recibe el impacto de un láser, que emite luz de una longitud de onda adecuada; las características propias de cada célula determinan un patrón específico de dispersión y de intensidad en la radiación emitida. Dicha radiación es captada y de-

purada por un sistema óptico, que concentra y transforma la señal convirtiéndola en pulsos de voltaje. Éstos son codificados e interpretados por un ordenador. Los datos obtenidos de esta manera pueden manejarse muy versátilmente, siendo de gran fiabilidad y exactitud. La citometría de flujo supera con mucho la capacidad de otras metodologías tradicionales y permite orientar el diagnóstico, clasificación y prognosis de numerosas enfermedades.

Las células pueden llevar acopladas moléculas fluorescentes (*labelling, tagging* o marcado molecular), que, una vez excitadas por el láser, emiten una respuesta fluorescente en una longitud de onda mayor, lo que facilita la identificación de subgrupos específicos dentro de las grandes poblaciones celulares. Cuando las células van desfilando en hilera por la zona de medida, donde la luz de láser interseca el chorro, cada célula etiquetada produce un breve destello fluorescente, cuya intensidad es directamente proporcional al número de copias marcadas presentes en la célula. Los marcadores (*fluorescent dyes*) se conjugan con los antígenos presentes en la superficie de la célula, actuando como señales de clasificación. Actualmente existen diferentes protocolos que permiten unir anticuerpos a compuestos fluorescentes. Entre los fluorocromos utilizados destacan el isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), diclorotriazinilaminofluoresceína (DTAF), Rojo Texas, bimane y otros. Son deseables ciertas propiedades biológicas en los marcadores fluorescentes, tales como su reactividad con grupos químicos, su unión no covalente a estructuras, su interacción con iones o radicales, su susceptibilidad a reacciones enzimáticas y su permeabilidad y retención a través de la membrana celular.

Un aspecto singular de la citometría de flujo es que mide la fluorescencia asociada individualmente a cada célula o partícula. En cambio, las mediciones espectrofotométricas se realizan en masa, valorándose la absorción o la transmisión de luz en porcentajes para el conjunto de la muestra. En la CMF, por el contrario, cada célula es interrogada individualmente por el láser. Para conseguirlo, y éste es uno de los aspectos centrales de la presente invención, es preciso asegurar una trayectoria predecible y secuencial de las células, que son enfocadas hidrodinamicamente para forzar su movimiento en fila dentro del eje de un chorro líquido.

Seguidamente, es tarea de unos tubos fotomultiplicadores (photo multiplier tubes, PMTs) y unos detectores de estado sólido el recoger las emisiones fotónicas de cada célula y convertirlas en diferencias de potencial analógicas. Las señales analógicas son luego digitalizadas mediante convertidores (analog to digital converters, ADCs) y almacenadas para su análisis posterior.

La citometría de flujo (CMF) permite la medición de numerosos parámetros de interés, tanto a nivel molecular, por fluorescencia (proteínas extracelulares, secuencias de ADN o ARN libres, complejos inmunes circulantes), como a nivel subcelular (viriones individuales, liposomas, cromosomas, orgánulos o núcleos aislados), a nivel celular (bacterias, hongos unicelulares, células humanas y animales, protoplastos vegetales) o a nivel supracelular (hibridomas y fusiones celulares, esferoides, organismos pluricelulares). También se pueden analizar parámetros intracelulares (componentes intracelulares, funciones intra-

celulares o entorno intracelular) y parámetros extracelulares (interacción con otras células, diferenciación celular).

Un aspecto importante de muchos sistemas de CMF es su capacidad para discriminar. En efecto, la citometría de flujo ha emergido como una herramienta poderosa en la diferenciación de subpoblaciones celulares. Para ello, el chorro portador de células es sometido a oscilación por medio de un cristal de cuarzo piezoeléctrico. La perturbación así inducida causa la rotura del chorro en microgotas, cuya frecuencia de generación es tan alta que cada gota tiene a lo sumo una sola célula. Si la célula en cuestión satisface los criterios exigidos, la gota portadora recibe un pulso de carga eléctrica. Seguidamente, se hace discurrir las gotas por un campo eléctrico que produce la deflexión del flujo y la separación de las subpoblaciones. Tales procesos de separación son actualmente comunes en el campo de la hematología experimental. Véase, por ejemplo, la descripción en *Flow Cytometry and Sorting*, second edition, M.R. Melamed, T. Lindmo, M.L. Mendelsohn, Editors. Wiley-Liss, New York, 1991.

Además de medir señales procedentes de los destellos fluorescentes de las células, los sistemas CMF permiten indicar otros aspectos de las células transeuntes, en particular el tamaño celular y la densidad. La luz láser incidental es dispersada de forma diferente dependiendo del tamaño relativo de la célula y de la presencia de orgánulos interiores. El tamaño y la densidad son parámetros esenciales en hematología para diferenciar tipos de células en la sangre.

Los componentes habituales de un sistema de CMF son:

- Inyección de la muestra y cámara de flujo
- Emisión de fluorescencia y bancada óptica
- Amplificación de las señales de fluorescencia
- Eliminación de señales no deseadas mediante un discriminador
- Cuantificación de las señales: Convertidor analógico-digital
- Clasificación de las señales: Histograma de frecuencias
- Presentación de datos: gráficos de puntos y proyecciones

En cuanto al campo de aplicaciones de la CMF, pueden citarse numerosos ámbitos. En la práctica clínica general, los sistemas CMF permiten el diagnóstico o el pronóstico basados en análisis celulares, la evaluación y monitorización del tratamiento, o el análisis de la lesión y muerte celular. Son amplias las aplicaciones diagnósticas de la citometría de flujo, tanto para caracterización de las células normales como para identificación y detección de células anormales. En terapéutica, se aplica para la selección de células en la terapia celular (análisis de progenitores en el trasplante autólogo, pruebas cruzadas en trasplantes heterólogos, detección y cuantificación de leucocitos residuales en hemopreparados), análisis de la acción terapéutica a nivel celular (cambios en parámetros estructurales o funcionales), análisis de la acción terapéutica a nivel del paciente (detección de recidivas y enfermedad mínima residual, establecimiento de patrones pronósticos de éxito terapéutico) o de-

tección y análisis de resistencia a la terapia (análisis de la captación y retención de fármacos, análisis del metabolismo de fármacos).

Son también abundantes las aplicaciones de la citometría de flujo en el análisis de la lesión y muerte celular: detección de lesión celular subletal (cambios en parámetros estructurales o funcionales), determinación de efectos citotóxicos globales (control de calidad de las preparaciones celulares), caracterización de los mecanismos de muerte celular (identificación y análisis de células apoptóticas, identificación de células necróticas). En inmuno-hematología se ha aplicado la CMF al análisis de antígenos (inmunofenotipo de superficie, detección de antígenos intracelulares o de antígenos circulantes), al análisis de anticuerpos (circulantes o unidos a células), al análisis de la función celular (proliferación, bioquímica, muerte celular). Véase por ejemplo en O'Connor, J.E., Guasch, R.M., Carretero, F. (1994) "Flow Cytometry: Technical Bases and Analytical Applications", en "Diagnostic Applications of Cytofluorimetric Methods Using Monoclonal Antibodies", European School of Transfusion Medicine, Milano, pp. 3-14; también puede consultarse en Sansonetti F., O'Connor, J.E. (1998) "Breve introdução á Citometria de Fluxo-Uma das alternativas para "fazer" Citologia e Citopatologia Analítica". Micron 1: 14-20.

Un campo en el que la CMF comienza a resultar relevante es en el de la identificación y cuantificación de ácidos nucleicos, tanto para fines de diagnóstico (identificación de secuencias génicas asociadas a organismos patógenos o a alteraciones genéticas del paciente) como a la cuantificación de cambios en los patrones de expresión génica. Véase en Wedemeyer N, Potter T (2001) "Flow cytometry: an "old" tool for novel applications in medical genetics". Clin Genet 60: 1-8.

Finalmente, se citan numerosas aplicaciones de la CMF en el campo ambiental, tales como el análisis de poblaciones unicelulares en su entorno (identificación y taxonomía, estimación de biomasa), la detección de contaminaciones, la detección de toxicidad *in situ* (marcadores de exposición, marcadores de efecto bioquímico, uso de microorganismos naturales o de laboratorio como indicadores de toxicidad, análisis genómico en células procedentes de organismos superiores).

En cuanto a las tendencias actuales, el sector de los citómetros de flujo está experimentando un acelerado cambio, tendente a reducir su tamaño y consumo energético. Se alcanzan prestaciones de hasta 100000 células por segundo, con identificaciones particularizadas que afectan a hasta una célula entre 10 millones. Asimismo es factible medir la dispersión de luz en dos o tres ángulos, la fluorescencia en 12 o más regiones espectrales.

#### Aspectos fluidomecánicos de la CMF

El objetivo del sistema fluido en CMF es el transportar una corriente hasta el haz de láser asegurando su exposición óptima y secuencial a la fuente lumínica. Para ello es preciso que sólo una célula o partícula transite a través del haz en cada momento. Esto se logra inyectando la muestra en una corriente de fluido envolvente dentro de la cámara de flujo. La muestra fluye como un núcleo coaxial con el fluido envolvente, manteniéndose guiada gracias a un principio hidrodinámico conocido como enfoque.

La llamada tecnología Flow Focusing o FF (Ga-

ñán-Calvo 1998, *Physical Review Letters* 80, 285), aplicando una geometría especial, utiliza la vía neumática para generar microchorros de líquido que posteriormente, pasado el orificio de salida, se rompen en gotas de tamaño muy pequeño y sustancialmente homogéneo. Esta última tecnología también es capaz de generar micro-chorros de líquido mediante otro líquido en lugar de gas, o bien puede generar micro-chorros de gas en el seno de un líquido (el mismo líquido u otro diferente usado como forzador, es decir, con el mismo papel desempeñado por el gas en el procedimiento neumático), con lo cual se generan microburbujas de tamaño homogéneo.

La presente invención pretende aplicar las ventajas de un diseño sencillo y robusto propias de la tecnología FF a la identificación en CMF.

#### Breve descripción de la invención

La presente invención hace referencia a un procedimiento y dispositivo asociado para la identificación y caracterización, así como a la posible separación, de unidades discretas (células eucarióticas, bacterias, virus, partículas portadoras de información biológica o genética, microcristales, partículas inertes, partículas-sonda con afinidad por sustancias a analizar, microcápsulas mono- o multivesiculares). Las citadas unidades se encuentran en suspensión en un líquido L que se hace circular en chorro laminar y estable mediante su extrusión concéntrica a través de un orificio, conjuntamente con otro fluido envolvente F, siendo F preferentemente un gas. El chorro compuesto resultante consta de un núcleo líquido en el que viajan en suspensión las unidades discretas objeto de interés, rodeado de la corriente constituida por el fluido envolvente F. Un sensor en correspondencia con el chorro compuesto se encarga de la identificación y caracterización secuencial de las unidades discretas.

El procedimiento propuesto se basa en la formación de un chorro que presenta un tramo laminar y estable, apto para la circulación secuencial de las unidades discretas objeto de análisis a alta velocidad; las condiciones para la formación del chorro se regulan mediante un rango de caudales dictado por variables fluidomecánicas del líquido portador y el fluido envolvente, preferentemente un gas.

En citometría son conocidos los procedimientos analíticos basados en el barrido óptico de un chorro líquido portador de células a analizar; sin embargo, los procedimientos convencionales se enfrentan a problemas de atascamiento en las boquillas y canalículos a través de los cuales se hace circular la suspensión celular y presentan escasa flexibilidad en cuanto al tamaño de las células o partículas a analizar, así como en cuanto al régimen de flujo. Se han propuesto alternativas basadas en la utilización de otro líquido auxiliar, que rodea durante la formación del chorro al líquido portador a fin de incrementar la estabilidad del flujo, evitar el taponamiento y aumentar las variables de control. Sin embargo, la presencia de este líquido auxiliar, que se mezcla con el portador, puede causar interferencias o contaminaciones, obliga a un mantenimiento costoso, y el volumen de residuo generado es grande.

Aspectos esenciales de la invención propuesta en las reivindicaciones siguientes son: (1) el carácter inmiscible de los dos fluidos utilizados, que evita interferencias o la migración de las partículas entre el líquido portador y el fluido envolvente; (2) la posibilidad de adaptar, sin modificar el dispositivo, el diá-

metro y régimen de flujo en el chorro a los requerimientos de circulación y de identificación de las unidades discretas; (3) la posibilidad de utilizar un gas, en particular aire, como fluido envolvente, con el consiguiente ahorro en componentes, eliminación de gran parte del volumen de residuos y simplificación en el procedimiento; (4) la simplicidad funcional resultante, que permite multiplicar en un mismo dispositivo el número de chorros y de haces sensores, multiplicándose así sustancialmente la productividad del sistema, con un volumen de residuo limitado.

#### Descripción de las figuras

La figura 1 muestra un dispositivo adaptado al procedimiento descrito para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, mostrándose los siguientes aspectos de la invención:

- (1) fuente de alimentación del líquido portador de las unidades discretas L;
- (2) boquilla de eyección del líquido portador L;
- (3) cámara a presión del fluido envolvente F;
- (4) orificio de salida del líquido portador L y del fluido envolvente F;
- (5) barrera impermeable que separa las fuentes de alimentación de ambos fluidos del ambiente exterior;
- (6) emisor;
- (7) sensor óptico o electromagnético.

El líquido L forma un chorro en el que viajan las unidades discretas objeto de identificación y caracterización secuencial, siendo enfocado hidrodinámicamente por un fluido envolvente F.

#### Modo de realización de la invención

La invención descrita en el presente documento contempla un procedimiento y su correspondiente dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético. La invención incluye dos fluidos inmiscibles: uno, necesariamente un líquido, tiene por misión transportar las unidades discretas objeto de estudio en una corriente organizada como chorro esbelto, de un diámetro característico superior o del orden del de las unidades discretas. El otro fluido es el enfocante (F): puede ser un gas, pero ello no es obligatorio. Ambos fluidos proceden de sendas fuentes independientes. Su movimiento se produce por impulsión debida a una sobrepresión de hasta 200 atm con respecto al ambiente exterior. Bajo dicha impulsión, ambos fluidos salen al exterior a través de uno o más orificios (4), con flujo simultáneo y concéntrico. Cada orificio está practicado en una barrera impermeable (5), que separa a las dos fuentes citadas del ambiente exterior. A través del orificio emerge un chorro de líquido portador L rodeado concéntricamente por el fluido envolvente F. Durante el flujo de salida de ambos fluidos, el fluido envolvente o enfocante rodea al chorro de líquido portador, moldeando bajo su simple acción aerodinámica a dicho líquido portador y asegurando su enfoque, es decir, la concentración del flujo del líquido portador en un chorro de diámetro reducido. Para ello es preciso ajus-

tar el caudal del chorro portador a un valor comprendido entre una y trescientas veces el cuadrado de la tensión superficial correspondiente a la interfase del líquido L y el fluido envolvente F, dividida por la raíz cuadrada del producto de la densidad del líquido L y la potencia tercera del incremento de presión  $\Delta p$ .

A fin de satisfacer los requerimientos de frecuencia de paso y umbral de detección del sensor es preciso también ajustar el diámetro y caudal (ligado a la frecuencia de paso de unidades discretas) del chorro. Sólo así es posible el registro por el sensor del paso de las unidades discretas y la caracterización en sucesión de cada una de ellas.

El fluido envolvente F puede ser (preferentemente) un gas, aunque este requisito no es obligatorio. Sin embargo, elegir un gas reporta grandes ventajas de economía y reduce el riesgo de contaminación del chorro portador por mezclado o arrastre con un líquido envolvente. Ha de observarse que el patrón de flujo FF evita totalmente el contacto del chorro portador con el orificio de salida (4).

En cuanto a la longitud del chorro portador, éste es un parámetro importante a fin de asegurar espacio suficiente para la zona de medida (intercepción por un haz láser u otro agente de medición). Es posible ajustar la viscosidad del líquido L haciendo que éste sea producto de la mezcla de al menos dos líquidos miscibles de viscosidad diferente y compatibles con las unidades discretas en suspensión, de tal forma que la longitud del chorro capilar sea superior a 300 micrómetros, preferentemente superior a 1 milímetro, medida a partir del orificio (4) hasta el punto donde el chorro capilar se disgrega en gotas.

Las unidades discretas portadas por el chorro pueden ser diversas: células, virus, microcristales, partículas inertes, partículas-sonda con afinidad por sustancias a analizar o microcápsulas mono- o multivesiculares.

El procedimiento puede incluir una etapa de separación de las unidades discretas mediante las técnicas habituales de desagregación de subpoblaciones (suministro de un pulso eléctrico a las unidades discretas marcadas positivamente, seguida de separación en un campo eléctrico).

Un aspecto principal de la invención es el guiado aerodinámico que el fluido enfocante ejerce sobre el líquido portador. Dicho efecto enfocante se produce sin necesidad de ningún campo eléctrico; y la emisión de un chorro fino o filamento de líquido portador se produce por razones meramente hidrodinámicas, como consta documentadamente en numerosas publicaciones ilustradoras del principio *flow-focusing*.

El objetivo que se persigue es la definición de un sistema fluídico, aplicado a CMF, que asegure las siguientes cualidades:

- Escaso caudal de líquido portador y de fluido enfocante;
- Robustez de materiales y de manejo;
- Facilidad de uso;
- Alta controlabilidad del diámetro y longitud del chorro portador;
- Reducción del riesgo de contaminación del fluido portador;
- Evitación del atasco del orificio de salida (4) (*clogging*).

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético (7), **caracterizado** porque incluye las siguientes etapas:

- 1) impulsión mediante una sobrepresión  $\Delta p$  de hasta 200 atm a través de un orificio (4), simultánea y concéntrica, de un líquido L portador de las unidades discretas, conjuntamente con otro fluido F inmiscible con él, que lo envuelve dando lugar a un chorro;
- 2) ajuste del caudal del chorro a un valor comprendido entre una y trescientas veces el cuadrado de la tensión superficial correspondiente a la interfase del líquido L y el fluido envolvente F, dividida por la raíz cuadrada del producto de la densidad del líquido L y la potencia tercera del incremento de presión  $\Delta p$ ;
- 3) ajuste del diámetro y el caudal del chorro a los requerimientos de frecuencia de paso y umbral de detección del sensor;
- 4) registro por el sensor del paso de las unidades discretas y caracterización en sucesión de cada una de ellas.

2. Procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el fluido envolvente F es un gas.

3. Procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque la viscosidad del líquido L se ajusta haciendo que éste sea producto de la mezcla de al menos dos líquidos miscibles de viscosidad diferente y compatibles con las unidades discretas en suspensión, de tal forma que la longitud del chorro capilar sea superior a 300 micrómetros, preferentemente superior a 1 milímetro, medida a partir del orificio hasta el punto donde el chorro capilar se disgrega en gotas.

4. Procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las unidades discretas son células.

5. Procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las unidades discretas son virus.

6. Procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las unidades discretas son microcristales.

7. Procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las unidades discretas son partículas inertes.

8. Procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las unidades discretas son partículas-sonda con afinidad por sustancias a analizar.

9. Procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las unidades discretas son microcápsulas mono- o multivesiculares.

10. Procedimiento para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en un chorro capilar en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético según las reivindicaciones 1-9, **caracterizado** porque el procedimiento incluye una etapa de separación de las unidades discretas.

11. Dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en uno o más chorros capilares en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, **caracterizado** porque incluye:

- 1) una fuente (1) del líquido L portador de las unidades discretas;
- 2) una fuente del fluido F envolvente;
- 3) una barrera impermeable (5), que separa a las dos fuentes citadas del ambiente exterior, y de la que emergen uno o más chorros de líquido portador L rodeados concéntricamente por el fluido envolvente F a través de uno o más orificios (4) correspondientemente practicados en dicha barrera;
- 4) un elemento que asegura una sobrepresión  $\Delta p$  de hasta 200 atm de las fuentes con respecto al ambiente exterior y permite que todos los caudales emergentes del o de los orificios (4) se encuentren en el rango descrito en la reivindicación 1;
- 5) un sensor (7), situado ante el tramo estable del o los chorros concéntricos, que registra las unidades discretas en tránsito secuencial.

12. Dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en uno o más chorros capilares en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el fluido envolvente F es un gas.

13. Dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en uno o más chorros capilares en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético,

co, según las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizado** porque las unidades discretas son células.

14. Dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en uno o más chorros capilares en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizado** porque las unidades discretas son virus.

15. Dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en uno o más chorros capilares en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizado** porque las unidades discretas son microcristales.

16. Dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en uno o más chorros capilares en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizado** porque las unidades discretas son partículas inertes.

17. Dispositivo para la identificación y caracteri-

zación secuencial de unidades discretas en suspensión en uno o más chorros capilares en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizado** porque las unidades discretas son partículas-sonda con afinidad por sustancias a analizar.

18. Dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en uno o más chorros capilares en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizado** porque las unidades discretas son microcápsulas mono- o multivesiculares.

19. Dispositivo para la identificación y caracterización secuencial de unidades discretas en suspensión en uno o más chorros capilares en régimen de flujo laminar, mediante un sensor óptico o electromagnético, según las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizado** porque incluye elementos para efectuar la separación de dichas unidades discretas del chorro capilar.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

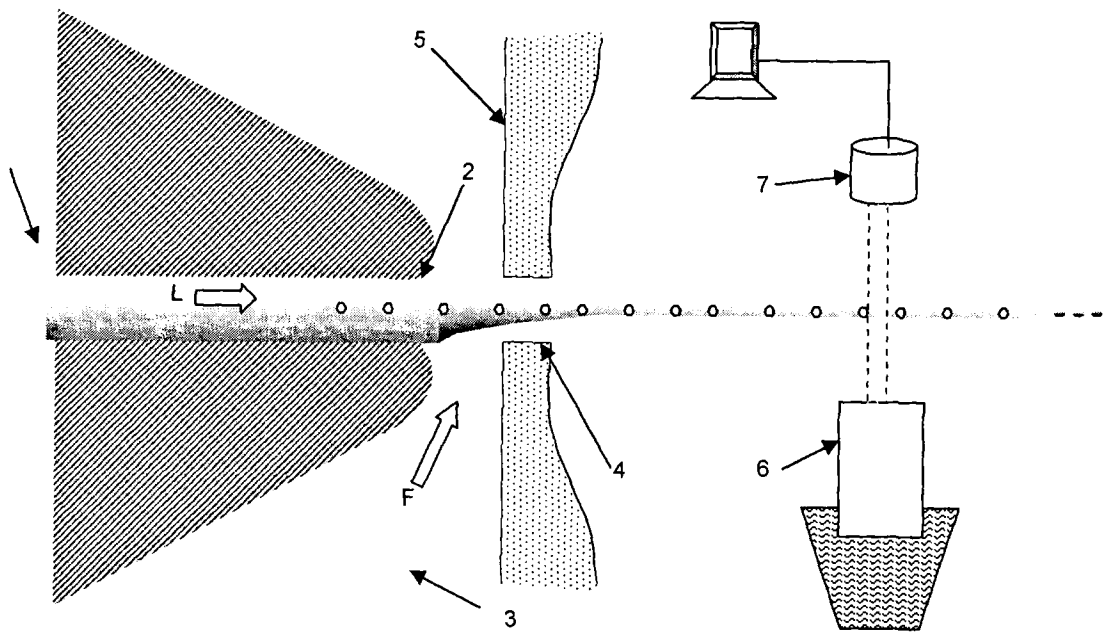


Fig. 1





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 255 349

② N° de solicitud: 200301500

③ Fecha de presentación de la solicitud: **25.06.2003**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 15/14** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2003054558 A1 (KURABAYASHI et al.) 20.03.2003, resumen; párrafos [4]-[8],[30]-[31],[44]-[47],[72]; figuras 1,7-8.	1-19
X	US 2002033939 A1 (HANSEN) 21.03.2002, resumen; párrafos [5]-[18],[51]-[56],[64]-[77]; figuras 1-6,12.	1,11

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<b>Fecha de realización del informe</b> 24.05.2006	<b>Examinador</b> A. Figuera González	<b>Página</b> 1/1
---	--	----------------------