

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 338**

21 Número de solicitud: 201130501

51 Int. Cl.:

G01N 35/10 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

31.03.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.10.2012

Fecha de la concesión:

18.10.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

30.10.2013

73 Titular/es:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)

Avda. de la Constitución, 18

41071 Sevilla (Sevilla) ES y

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (50.0%)

72 Inventor/es:

ALONSO ORTIZ, Antonio;

CABALLERO GONZÁLEZ, Abelardo y

MIRANDA SAYAGO, Jose Maria

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **PROCEDIMIENTO Y APARATO PARA APLICAR UN LÍQUIDO EN AL MENOS UN POCILLO DE UNA PLACA**

57 Resumen:

Procedimiento y aparato para aplicar un líquido en al menos un pocillo de una placa. La invención describe un procedimiento y aparato que aprovecha las propiedades de la viscosidad y tensión superficial de los líquidos para llenar al menos un pocillo de una placa mientras se mantiene ésta en posición invertida, comprendiendo el aparato: un depósito (2) de líquido dotado de al menos un orificio (3) de retorno; una matriz de agujas (4) dispuestas verticalmente en la superficie superior del depósito que están dotadas de unos conductos interiores de las agujas conectados al depósito (2) de líquido; y una bomba (5) configurada para impulsar el líquido del depósito (2), de modo que colocando una placa (100) invertida encima de la matriz de agujas (4) se consigue que una porción del líquido quede adherido a los pocillos (101) por el efecto de la tensión superficial, retornando el resto del líquido al interior del depósito (2) a través del orificio (3) de retorno.

ES 2 389 338 B1

DESCRIPCION

**PROCEDIMIENTO Y APARATO PARA APLICAR UN LÍQUIDO EN AL
MENOS UN POCILLO DE UNA PLACA**

OBJETO DE LA INVENCION

5

El objeto principal de la invención es un novedoso procedimiento que aprovecha las propiedades de la viscosidad y tensión superficial de los líquidos para llenar al menos un pocillo de una placa de pocillos mientras se mantiene ésta en posición invertida.

10

Otro objeto de la invención es un aparato capaz de llenar de líquido al menos un pocillo de una placa empleando el procedimiento anterior.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Para realizar cultivos y pruebas de diferentes tipos son conocidas unas placas dotadas de una pluralidad de pocillos (existen, por ejemplo, placas de 96 pocillos). Normalmente, el primer paso para realizar el cultivo o prueba en cuestión es llenar cada pocillo de la placa con un líquido determinado. Este proceso resulta extremadamente tedioso, ya que suele realizarse de forma manual depositando una gota por pocillo con la ayuda de un gotero. Otro inconveniente de este método es que se derrama mucho líquido, ensuciando la superficie de la mesa sobre la que se lleva a cabo, y además en modo alguno se obtienen volúmenes iguales en todos los pocillos: mientras unos se derraman los otros se quedan a medio llenar.

25

DESCRIPCION DE LA INVENCION

30

La presente invención resuelve los problemas anteriores gracias a un novedoso procedimiento donde la aplicación del líquido se realiza con la placa en posición invertida, aprovechándose el efecto predominante de la tensión superficial en distancias pequeñas para que el líquido se adhiera a la superficie

interior del pocillo o pocillos. Una gran ventaja de este procedimiento es que se consiguen llenar uniformemente de líquido todos los pocillos de una forma mucho más rápida y más limpia. Alternativamente, si se llena sólo un pocillo de cada placa, se consigue llenar con la misma cantidad de líquido dicho único
5 pocillo de varias placas consecutivas.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención está dirigido de manera general a un procedimiento para aplicar un líquido a al menos un pocillo de una placa, comprendiendo el procedimiento los pasos de: colocar la
10 placa en posición invertida; y aplicar el líquido a cada pocillo desde debajo de dicha placa. Además, puesto que la viscosidad y tensión superficial de un líquido cualquiera son dependientes de la temperatura, el procedimiento de la invención preferentemente comprende además modificar la temperatura del líquido previamente a su aplicación en los pocillos. De ese modo, se consigue
15 controlar el volumen de líquido que queda adherido al pocillo o pocillos: a mayor temperatura, menor cantidad de líquido queda adherido a los pocillos.

Nótese que en este documento, el término "líquido" pretende hacer referencia no sólo a líquidos propiamente dichos, sino en general cualquier
20 sustancia capaz de fluir lo suficiente como para ser impulsada con una bomba y pasar a través de los conductos de las agujas.

Un segundo aspecto de la invención está dirigido a un aparato para aplicar un líquido a al menos un pocillo de una placa empleando el
25 procedimiento descrito, donde el aparato comprende medios para aplicar el líquido estando la placa en posición invertida. Preferentemente, dichos medios comprenden fundamentalmente: un depósito que almacena el líquido, una bomba que lo impulsa, y una matriz de agujas que aplica el líquido a los pocillos. A continuación, se describe con mayor detalle cada uno de estos
30 elementos:

- Depósito

Se trata de un depósito que almacena el líquido que se desea aplicar a la placa. Puesto que no todo el líquido bombeado a través de las agujas queda adherido a los pocillos y por lo tanto vuelve a caer hacia el depósito, la superficie superior de dicho depósito comprende al menos un orificio de retorno en su superficie superior. Este orificio podría tener cualquier forma, siempre que su tamaño sea suficiente como para permitir el retorno de todo el líquido no adherido a los pocillos, evitando así que chorree por los laterales del aparato. En cuanto a su ubicación y número, en principio también podría ser cualquiera. Por ejemplo, podría concebirse un depósito con una superficie superior inclinada o conformada de manera obligase al líquido a dirigirse hacia un único orificio de retorno. Otra solución, correspondiente a una realización preferida de la invención, es configurar el orificio u orificios de manera que rodeen sustancialmente la matriz de agujas, de modo que el líquido no tiene otro camino más que retornar al depósito.

15

Preferentemente, el aparato de la invención además comprende un reborde de apoyo para la placa de pocillos, facilitándose así la colocación adecuada de la placa sobre el depósito (es decir, de modo que cada aguja quede introducida en el pocillo correspondiente).

20

- Matriz de agujas

Se trata del elemento que lleva a cabo la aplicación efectiva del líquido en los pocillos. En este documento, el término "*agujas*" pretende hacer referencia no sólo a agujas hipodérmicas propiamente dichas, sino en general a cualquier conducto delgado, fabricado en cualquier material, que permita la aplicación de líquido en las condiciones que se describen en esta solicitud. Además, se entiende que la "*matriz*" más básica podría estar constituida por una única aguja (en caso de que el aparato estuviese configurado para llenar un solo pocillo de una placa).

30

Las agujas están dispuestas verticalmente con la punta en su extremo

superior, formando una matriz sobre la superficie superior del depósito y siendo la posición de las agujas correspondiente con la posición de los pocillos que se desea llenar con líquido cuando la placa está correctamente situada. Los extremos inferiores de las agujas están conectados por su base al
 5 depósito, permitiendo así que el líquido del depósito suba por los conductos de las agujas hasta salir por la punta de las mismas.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el aparato de la invención comprende además una pieza de protección paralela a la
 10 superficie superior del depósito y dotada de una matriz de orificios configurados para el paso de las puntas de la matriz de agujas. Así, la base de las agujas está fijada a la superficie superior del depósito, pero la pieza de protección sirve de protección a las mismas, dejando visible sólo la punta. Además, estos orificios tienen una holgura alrededor de las puntas de las
 15 agujas para permitir el paso del líquido de retorno hacia el depósito.

- Bomba

Se trata de una bomba adecuada para impulsar el líquido del depósito, provocando su ascensión a través de los conductos interiores de las agujas hasta salir a través de las puntas de dichas agujas. De ese modo, cuando se
 20 coloca una placa de pocillos en posición invertida encima de la matriz de agujas, estando la punta de las agujas en contacto con, o muy cerca de, el fondo de cada pocillo, el líquido bombeado queda adherido a los pocillos por el efecto de la tensión superficial. A medida que se bombea, el líquido se va
 25 acumulando en los pocillos hasta que las fuerzas gravitatorias superan a las fuerzas debidas a la tensión superficial, momento en cual el líquido en exceso comienza a desprenderse del pocillo y a chorrear hacia el interior del depósito a través del orificio u orificios de retorno descritos anteriormente.

30

Existen diferentes configuraciones posibles para el sistema de bombeo en general, y la propia bomba en particular. La bomba, por ejemplo, podría

estar sumergida en el interior del depósito. Otra opción sería situar la bomba junto al depósito, facilitándose así las tareas de mantenimiento de la misma. En cualquier caso, la bomba preferentemente está conectada mediante un conducto de alimentación a un sub-depósito interior comprendido dentro del
5 depósito, estando este sub-depósito interior conectado a su vez directamente a las agujas. Así, al accionar la bomba el líquido sube por el conducto de alimentación causando un aumento de la presión en el sub-depósito, que a su vez provoca que el líquido suba por los conductos de las agujas hasta salir por la punta, quedando adherido a los pocillos según se ha
10 explicado anteriormente.

Existen diferentes modos de controlar el flujo de líquido bombeado a las agujas. Por ejemplo, la propia bomba podría ser regulable. Otra posibilidad, según una realización preferente de la invención, es que el conducto de
15 alimentación tenga una vía de escape lateral regulable. De ese modo, cuando se desea disminuir el flujo bombeado basta con abrir la vía de escape, saliendo así parte del líquido bombeado al interior del depósito antes de alcanzar el sub-depósito. En caso de que se desee aumentar el flujo, bastaría con cerrar la vía de escape en la medida deseada para reducir el volumen de
20 líquido que escapa al depósito.

Además, como se ha mencionado anteriormente se puede aprovechar la variación de la viscosidad y tensión superficial con la temperatura para modificar el volumen de líquido que queda adherido al pocillo. En efecto, el
25 volumen de líquido que queda adherido al pocillo depende del momento en el que se alcanza el equilibrio entre las fuerzas de tensión superficial y las fuerzas gravitatorias: a medida que aumenta el volumen de líquido adherido al pocillo, van aumentando también las fuerzas gravitatorias hasta llegar a un momento en el cual el exceso de líquido cae, volviendo al depósito por el
30 orificio de retorno. Teniendo en cuenta que la viscosidad y la tensión superficial descienden al aumentar la temperatura, calentar el líquido tiene el efecto de disminuir el volumen de líquido que queda adherido al pocillo.

En consecuencia, en una realización preferida de la invención el aparato comprende medios de calentamiento del líquido contenido en el depósito, preferentemente una resistencia. Es más, según otra realización preferida el aparato comprende un termostato regulable desde el exterior del
5 depósito para controlar la temperatura de calentamiento.

Este procedimiento y aparato se podrían utilizar en principio con cualquier líquido, aunque a mayor tensión superficial del líquido, mayor será el volumen atrapado en los pocillos. Además, es evidente que sería aplicable a
10 placas con cualquier número de pocillos. Es más, sería posible configurar la disposición de las agujas y diferentes rebordes de apoyo para conseguir un aparato versátil capaz de llenar placas de diferentes tamaños.

Por último, preferentemente la bomba es de funcionamiento en
15 continuo, de modo que el técnico sólo tiene que colocar sucesivamente placas sobre el aparato, esperar a que el líquido empiece a caer al depósito (lo cual es señal de que los pocillos están llenos) y pasar a la siguiente placa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20

La Fig. 1 muestra una vista en sección de un ejemplo del aparato de la presente invención lleno con aceite.

La Fig. 2 muestra una vista en sección de una placa de pocillos
25 convencional.

La Fig. 3 muestra una vista en sección de un ejemplo del aparato de la invención durante la aplicación de aceite a una placa de pocillos.

30 La Fig. 4 muestra una vista en sección de la placa de pocillos cuando se ha alcanzado el volumen final de aceite en cada pocillo, retornando el exceso de aceite al depósito.

REALIZACIÓN PREFERIDA DE LA INVENCION

Se describe a continuación un ejemplo del aparato (1) de la invención haciendo referencia a las figuras adjuntas. En particular, en la Fig. 1 se
5 aprecian las partes que componen el aparato (1) de la invención en posición de reposo: un depósito (2) cuya parte superior está dotada de unos orificios (3) de retorno; una matriz de agujas (4) que se comunican con un sub-depósito (10), el cual está a su vez comunicado gracias a un conducto (9) de comunicación con la bomba (5). Se puede apreciar cómo el conducto (9) de
10 comunicación tiene una vía (11) de escape, que se ha representado abierta en la Fig. 1, que permitirá regular el caudal de aceite que se bombea hacia las agujas (4).

La parte superior del aparato (1) también cuenta con una pieza (6) de
15 protección que cubre la parte superior del depósito (2) y la base de las agujas (4), y que está dotada de una matriz de orificios (7) de paso de las puntas de las agujas (4). Se observa cómo existe entre los orificios (7) y las agujas (4) una distancia que permite que el aceite que caiga de la placa vuelva a entrar en el depósito (2). Además, unos rebordes (8) de apoyo permiten colocar
20 adecuadamente la placa (100) de pocillos (101) que se desea rellenar: se asegura así que la posición de los pocillos (101) corresponde con la de las agujas (4), y que la punta de las agujas (4) queda en contacto, o casi, con el fondo de los pocillos (101).

Se ha representado también en las figuras un medio (12) de
25 calentamiento, en este ejemplo una resistencia, que servirá para calentar el aceite y así modificar la cantidad del mismo que queda adherida a la placa (100). La resistencia está conectada a un termostato (13) que permite regular la temperatura del aceite desde el exterior del aparato simplemente girando
30 una rueda.

La Fig. 2, por otro lado, muestra una placa (100) de pocillos (101) convencional.

De este modo, como se ha representado en la Fig. 3, cuando la bomba
5 (5) está en funcionamiento el aceite sube por el conducto (9) de alimentación, llega al sub-depósito (10) y asciende a través de las agujas (4) hasta salir por la punta. Cuando se coloca sobre las agujas (4) una placa (100) en posición invertida, cada una de las agujas (4) queda introducida en uno de los pocillos (101) y tocando, o casi, el fondo. El aceite que sube por cada aguja (4)
10 comienza así a quedar adherido a los pocillos (101), aumentando poco a poco el volumen de aceite de cada pocillo (101). En un momento determinado deja de acumularse aceite, bien porque el pocillo (101) está completamente lleno (como se ha representado en la Fig. 4), o bien antes debido a que se ha alcanzado el equilibrio entre las fuerzas de tensión superficial y las fuerzas
15 gravitatorias. En ese momento, el aceite sobrante empieza a resbalar por las agujas (4) hacia abajo o a gotear de los pocillos (101), se introduce por los orificios (7) de la pieza (6) de protección y termina volviendo al depósito por los orificios (3) de retorno.

20 Si se desea aumentar el flujo de aceite, basta con cerrar gradualmente la vía (11) de escape hasta conseguir el flujo deseado. Por otro lado, si se desea disminuir la cantidad de aceite adherida a cada pocillo (101) al final del proceso, basta con accionar el termostato (13) para activar la resistencia (12). Al subir la temperatura del aceite, la tensión superficial baja y por tanto la
25 cantidad de aceite adherido a los pocillos (101) al final del proceso también será menor. Así, jugando con la temperatura del aceite, se consigue regular la cantidad administrada a cada pocillo (101) según cada aplicación particular.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para aplicar un líquido en al menos un pocillo (101) de una placa (100), caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
 - colocar la placa (100) en posición invertida; y
 - aplicar el líquido a cada pocillo (101) desde debajo de la placa (100).
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende el paso de modificar la temperatura del líquido previamente a su aplicación a los pocillos (101).
3. Aparato (1) para aplicar un líquido en al menos un pocillo (101) de una placa (100), caracterizado porque comprende medios para aplicar el líquido en el pocillo (101) estando la placa (100) en posición invertida, y donde dichos medios comprenden, asimismo:
 - un depósito (2) de líquido dotado de al menos un orificio (3) de retorno en su superficie superior;
 - una matriz de agujas (4) dispuestas verticalmente en la superficie superior del depósito y cuya posición es correspondiente con los pocillos (101) que se desea llenar con líquido, estando unos conductos interiores de las agujas conectados al depósito (2) de líquido; y
 - una bomba (5) configurada para impulsar el líquido del depósito (2) provocando su ascensión a través de los conductos interiores de las agujas (4) hasta salir a través de las puntas de dichas agujas, de tal modo que colocando una placa (100) invertida encima de la matriz de agujas (4) se consigue que una porción del líquido quede adherido a los pocillos (101) por el efecto de la tensión superficial, retornando el resto del líquido al interior del depósito (2) a través del al menos un orificio (3) de retorno.
4. Aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 3, donde el al menos un

orificio (3) de retorno está dispuesto de modo que rodea sustancialmente la matriz de agujas (4).

5. Aparato (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde el depósito (2) tiene una superficie superior plana.

6. Aparato (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-5, que además comprende una pieza (6) de protección paralela a la superficie superior del depósito (2) y dotada de una matriz de orificios (7) configurado para el paso de las puntas de la matriz de agujas (4).

7. Aparato (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-6, que además comprende un reborde (8) de apoyo para la placa (100) de pocillos (101).

8. Aparato (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-7, donde la bomba (2) está sumergida en el interior del depósito (2) o situada junto al depósito (2).

9. Aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 8, donde la bomba (2) es de funcionamiento continuo.

10. Aparato (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-9, donde la bomba (2) está conectada mediante un conducto (9) de alimentación a un sub-depósito interior (10) situado en el interior del depósito (2), y que a su vez está directamente conectado a las agujas (4).

11. Aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 10, donde el conducto (9) de alimentación tiene una vía de escape (11) lateral regulable que controla el flujo de líquido que sale a través de las agujas (4).

12. Aparato (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-11,

que además comprende un medio (12) de calentamiento del líquido contenido en el depósito (2).

13. Aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 12, donde el medio (12) de calentamiento es una resistencia.

14. Aparato (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-13, que además comprende un termostato (13) regulable desde el exterior del depósito (2) para controlar la temperatura de calentamiento.

15. Aparato (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-14, donde el líquido es aceite.

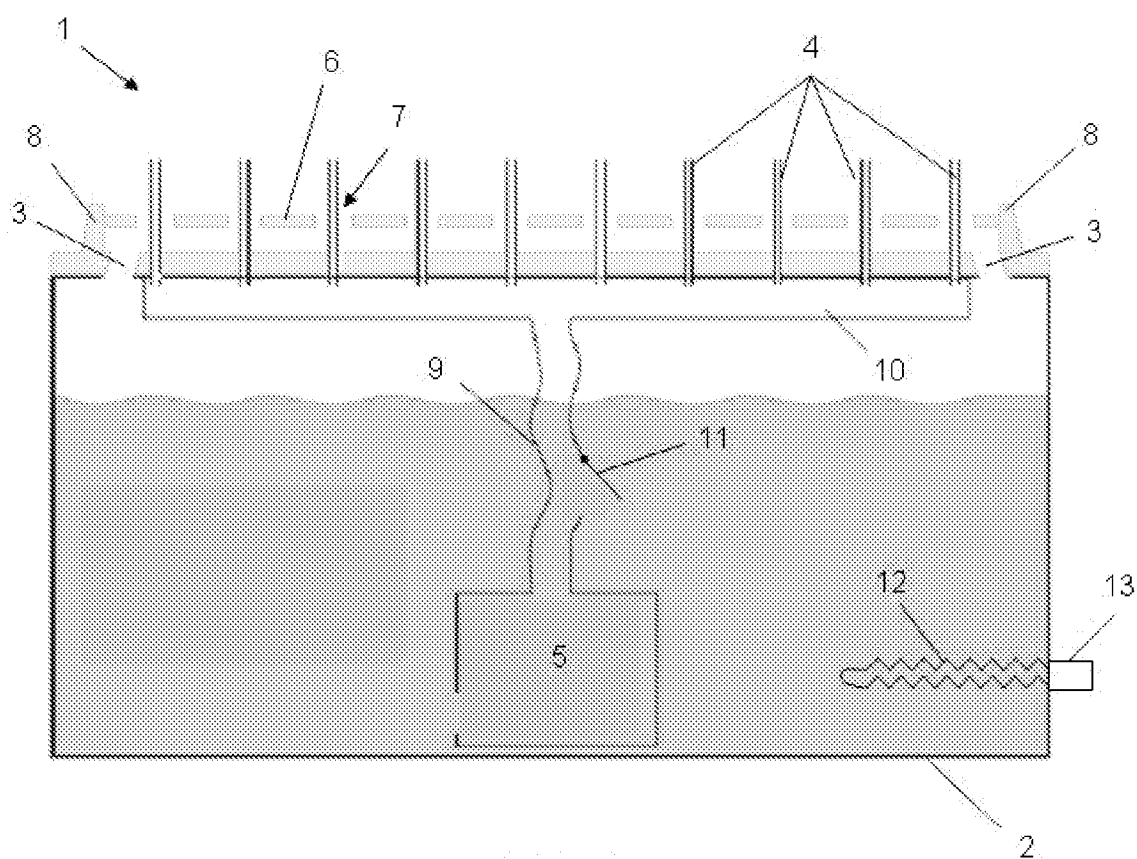


FIG. 1

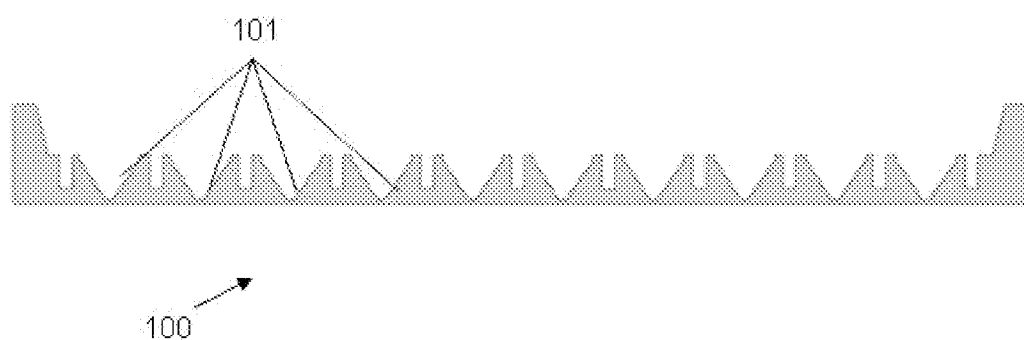
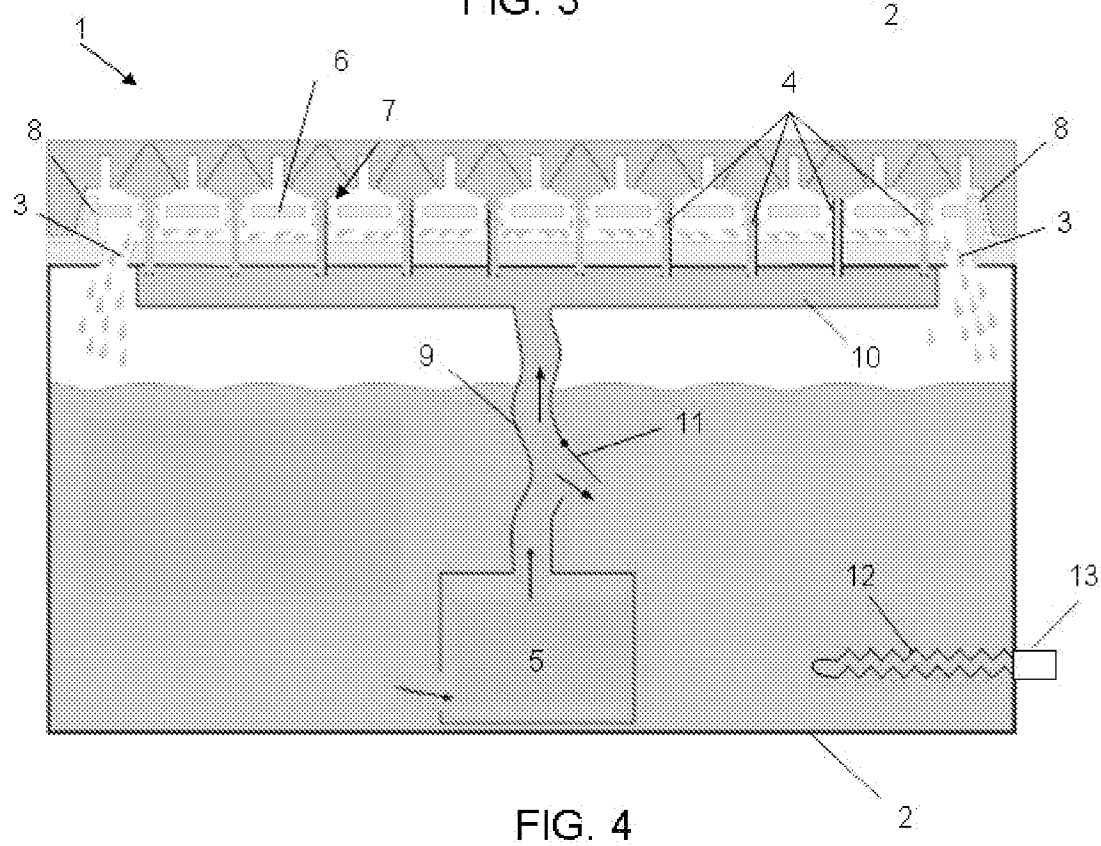
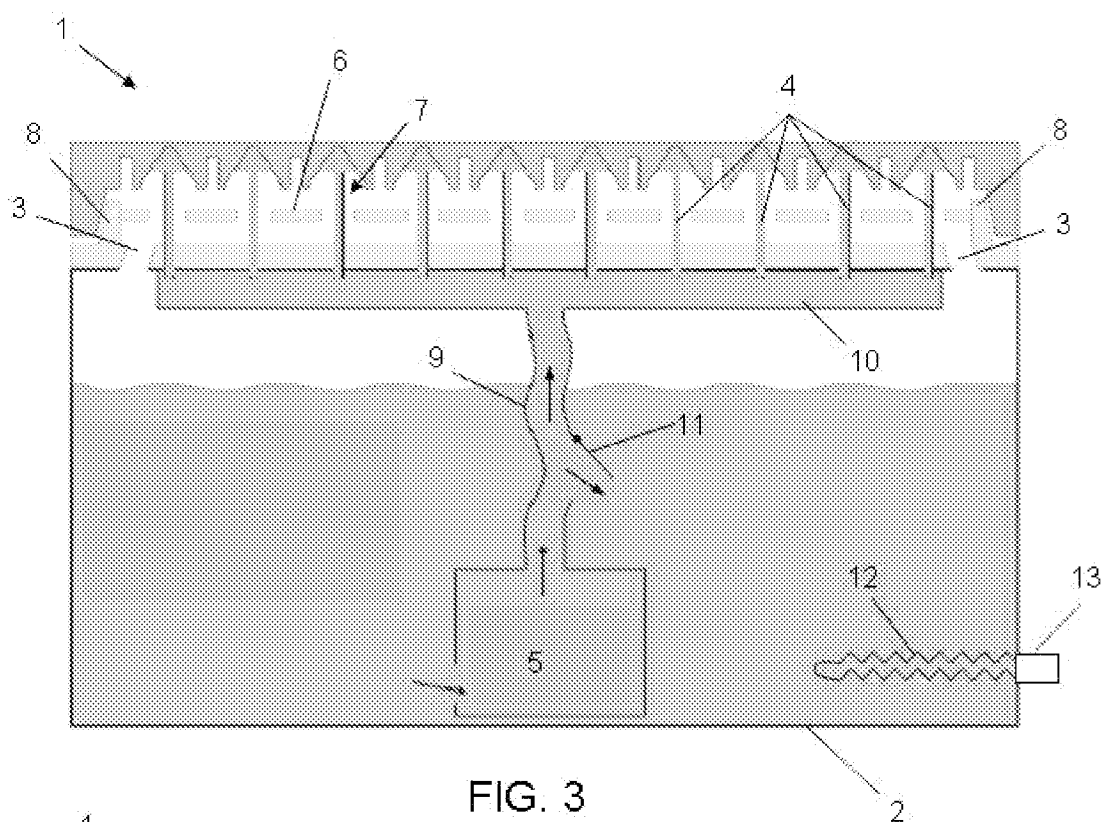


FIG. 2





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130501

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N35/10** (2006.01)
B01L3/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2002/0044894 A1 (LEBL ET AL.) 18.04.2002, Párrafo 10 y reivindicación 28.	1
A	US 2005/0226782 A1 (REED ET AL.) 13.10.2005, Todo el documento.	1-15
A	GB 2107054 A (CULTURE TEK CORPORATION) 20.04.1983, Todo el documento.	1-15
A	WO 2010/151467 A1 (HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 29.12.2010, Todo el documento.	1-15

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:

Fecha de realización del informe
23.07.2012

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, B01L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.07.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-15	SI
	Reivindicaciones 1	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2-15	SI
	Reivindicaciones 1	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2002/0044894 A1 (LEBL et al.)	18.04.2002
D02	US 2005/0226782 A1 (REED et al.)	13.10.2005
D03	GB 2107054 A (CULTURE TEK CORPORATION)	20.04.1983
D04	WO 2010/151467 A1 (HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB)	29.12.2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un procedimiento para aplicar líquido en al menos un pocillo de una placa en posición inversa (reivindicaciones 1-2) y el aparato para realizar dicho procedimiento (reivindicaciones 3-15).

El documento D01 consiste en un aparato para la síntesis combinatoria de moléculas orgánicas, ácidos nucleicos particularmente.

El documento D02 consiste en un aparato para llenar una microplaca con una pluralidad de pocillos.

El documento D03 consiste en un dispositivo de pipeta para transferir o retirar muestras líquidas hacia y desde una placa multipocillos.

El documento D04 consiste en un método para resuspender resina cromatográfica en una placa precargada.

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).**1.1.- Reivindicación 1**

El documento D01 se considera el más próximo del estado de la técnica al objeto de la reivindicación 1, y divulga un procedimiento para aplicar un reactivo en una placa multipocillo, donde dicha placa está en posición invertida de forma que al aplicar el reactivo a los pocillos al menos una parte de la solución puede drenar por gravedad desde los pocillos de reacción (ver párrafo 10 y reivindicación 28).

Las características de la reivindicación 1 ya son conocidas del documento D01. Por lo tanto, la reivindicación 1 no es nueva ni implica actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1981.

1.2.- Reivindicaciones 2-15

Los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica, y no se consideran de particular relevancia respecto a las reivindicaciones 2-15. Así, las reivindicaciones 2-15 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.