

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 998**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2015 PCT/EP2015/068014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020414**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2015 E 15744611 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3177401**

54 Título: **Método para fusionar o poner en contacto gotitas de reactor y de reactivo en un dispositivo microfluídico o milifluídico**

30 Prioridad:

06.08.2014 EP 14306248

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.04.2021

73 Titular/es:

**ETABLISSEMENTS J. SOUFFLET (25.0%)
Quai du Général Sarrail
10400 Nogent-sur-Seine, FR;
ECOLE SUPÉRIEURE DE PHYSIQUE ET DE
CHIMIE INDUSTRIELLES DE LA VILLE DE PARIS
(25.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%) y
SORBONNE UNIVERSITÉ (25.0%)**

72 Inventor/es:

**GARNICA RODRIGUEZ, JAIRO IVAN;
BOITARD, LAURENT;
DREVELLE, ANTOINE, SERGE, DOMINIQUE;
BREMONT, NICOLAS, PIERRE y
BIBETTE, JÉRÔME**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 817 998 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para fusionar o poner en contacto gotitas de reactor y de reactivo en un dispositivo microfluídico o milifluídico

5

Los reactores de flujo basados en gotitas han demostrado ser de particular valor para la síntesis controlada de materiales funcionales cuyas propiedades están fuertemente influidas por las condiciones de reacción. Por ejemplo, se han demostrado mejoras significativas en el control del producto (con respecto a la síntesis tanto por lotes como por flujo continuo) para un amplio intervalo de materiales optoelectrónicos, incluyendo nanocristales metálicos, puntos cuánticos y polímeros conjugados. Hasta la fecha, sin embargo, la síntesis de gotitas se ha limitado en gran medida a procedimientos simples de una sola etapa, en los que todos los reactivos se cargan en las gotitas desde el principio, lo que restringe en gran medida el intervalo de productos químicos que se pueden emplear. Para explotar adecuadamente los beneficios del flujo de gotitas, y ampliar la paleta de productos químicos/materiales accesibles, existe una necesidad obvia de desarrollar reactores de gotitas de múltiples etapas en los que los reactivos se puedan añadir secuencialmente a las gotitas que fluyen a medida que avanza la reacción.

En un procedimiento de flujo de gotitas, la fase continua es un líquido que humedece preferentemente las paredes del canal, y la fase de reactivo se divide en un tren de gotitas discretas, casi idénticas de bajo volumen que viajan a través del canal a una velocidad común. La composición de las gotitas puede variar de una gotita a otra, cuando se desean gotitas con diferentes principios activos o cuando las gotitas contienen un ingrediente progresivo (tal como en crecimiento) tal como microorganismos, típicamente esporas de hongos. Debido a sus pequeños volúmenes (típicamente submicrolitros), las gotitas son extremadamente uniformes con respecto a la composición química y la temperatura, y por lo tanto proporcionan un ambiente altamente controlado para llevar a cabo reacciones químicas. Además, dado que las gotitas se mantienen alejadas de las paredes del canal por la fase continua, la posibilidad de ensuciamiento del reactor debido a la precipitación de reactivos o productos en la pared del canal se elimina virtualmente, asegurando un entorno de reacción estable e inmutable.

La fusión de gotitas es una operación muy importante para la micro/milifluídica digital, ya que permite la combinación de reactivos para el inicio de reacciones biológicas y/o químicas. En un canal fluídico, la coalescencia de gotitas requiere la eliminación de la fase continua que las separa. Cuando dos gotitas entran en contacto cercano, se forma un delgado puente líquido entre las gotitas. El menisco de alta curvatura formado alrededor del puente crea un desequilibrio de la tensión superficial que une las dos gotitas. Para la coalescencia, es necesario un contacto cercano entre las gotitas durante un tiempo mínimo crítico. Para lograr la fusión de gotitas, se requiere sincronización espacial y temporal. Las tecnologías de fusión de gotitas existentes exhiben diseños de canales complejos desventajosos y/o contaminación entre gotitas. La presente invención permite la inyección autosincronizada de gotitas de reactivo y su fusión, ventajosamente su fusión pasiva, con gotitas de reactor en sistemas fluídicos trifásicos sin contaminación entre gotitas, así como sin contaminación del depósito de reactivo, en diseños de canales simples.

40

Tecnologías existentes

Fusión pasiva de gotitas

La fusión pasiva de gotitas mediada por la geometría se basa en el drenaje de la fase continua en los volúmenes de expansión (figura 1). Este método se caracteriza por una ventajosa baja contaminación entre gotitas, pero requiere canales de complejidad de diseño adicional y exhibe rendimientos más bajos que los métodos de fusión activa.

La fusión pasiva de gotitas inducida por la humectabilidad de la superficie (figura 2) se basa en el uso de parches hidrófilos para inducir la fusión entre pares de gotitas acuosas. A pesar de no requerir sincronización de gotitas, la principal desventaja de este método es la alta contaminación entre gotitas durante el paso a través del parche humectante.

En otro método pasivo, los reactivos se añaden para hacer pasar las gotitas (figura 3). Aunque la contaminación entre gotitas se ha reducido (pero no se ha detenido) mediante el uso de canales estrechos hidrófilos, este enfoque tiene un bajo control de la cantidad específica de reactivo añadida a una gotita que pasa, ya que la inyección exitosa de reactivo al sustrato requiere un equilibrio cuidadoso de los caudales volumétricos de las fases continuas y dispersas.

60

Fusión activa de gotitas

Los métodos de fusión activa de gotitas son más complejos que muchos esquemas de fusión pasiva de gotitas, ya que muchos requieren la fabricación de electrodos y la sincronización precisa de las señales eléctricas para fusionar las gotitas. Estos métodos usan electricidad para generar las inestabilidades de tensión superficial requeridas para la coalescencia de las gotitas. Uno de los diseños más avanzados es el picoinyector que se

65

muestra en la figura 4. Cuando una gotita pasa por el picoinyector, los electrodos se activan, produciendo una inestabilidad de película delgada en la interfaz agua/aceite que permite que el reactivo entre en la gota. Se reivindicó un alto rendimiento (varios kilohercios) y una precisión de inyección de subpicolitro. El principal inconveniente de este método es la posible contaminación del depósito de la disolución de inyección durante la fusión in situ con una gotita que pasa. Del uso de la electricidad surgen preocupaciones sobre la biocompatibilidad de las señales eléctricas en moléculas biológicas, tales como ADN o proteínas.

Sistema microfluídico trifásico

El documento WO2008/79274 describe un sistema microfluídico trifásico que comprende una fase continua, gotitas de reactor, y un espaciador. El espaciador está formado por líquidos inmiscibles o partículas hidrófobas para evitar la coalescencia de las gotitas de reactor. Esta solicitud asimismo describe la adición de gotitas de reactivo por inyección usando un dispositivo microfluídico de unión en T, pero no describe específicamente cómo ocurre la inyección. En particular, no enseña ni sugiere romper la gotita de reactivo antes de la coalescencia. El método utilizado en la presente memoria no evitará la contaminación, en particular la contaminación del depósito, sino asimismo la contaminación entre las gotitas que fluyen, en particular cuando el tren no es regular. El método utilizado en la presente memoria no se sincroniza automáticamente y no permitirá controlar ni ajustar el volumen de la gotita de reactivo caso por caso. Además, el método utilizado en la presente memoria no permitirá seleccionar la gotita de reactor "diana".

Descripción de las figuras:

Figura 1: Fusión pasiva de gotitas mediada por geometría (técnica anterior)

Figura 2: Fusión pasiva de gotitas inducida por humectabilidad superficial (técnica anterior)

Figura 3: Reactivos añadidos a las gotitas que pasan (técnica anterior)

Figura 4: Picoinyector en un sistema de fusión activa de gotitas mediante el uso de electrodos (técnica anterior)

Figura 5: Sistema micro/milifluídico trifásico de la invención

Figura 6: Imágenes de las etapas principales de un esquema de fusión autosincronizado preferido de la invención: 6a: Generación de gotitas de reactivo; 6b: Desprendimiento de gotitas de reactivo de la boquilla; 6c: Contacto con gotitas y drenaje de fase continua; 6d: Fusión de gotitas

Figura 7: Representación esquemática del tapón de espaciador en la invención, en la que la zona de inyección es IZ, D es el diámetro del canal, L la longitud del tapón de espaciador.

Figura 8: Elementos principales del módulo de fusión auto-sincronizado. 1. Tubo de teflón. 2. Depósito de reactivos. 3. Orificio perforado. 4. Gotita de reactivo inyectado. 5. Gotita de reactor. 6. Fase continua de aceite fluorado. 7. Espaciador de aire comprimido. 8. Montaje de colector acrílico. 9. Tuerca de montaje. 10. Electroválvula.

Figura 9a: Señal de fluorescencia del tren milifluídico fúngico añadido

Figura 9b: Señal de fluorescencia del tren milifluídico fúngico añadido (aumento)

Figura 10: Actividad enzimática de una biblioteca mutante de *A. niger*

Figura 11: Circuito equivalente del dispositivo

Figura 12: Gráfico para la predicción del modelo de desprendimiento frente a las medidas del radio de gotita mínimo

Figura 13: Inyección de volumen variable --- señal de fluorescencia

Figura 14: Inyección de volumen variable --- aumento del tamaño de gotita inyectada

Figura 15: Inyección de volumen variable --- relación V_T/V_R calculada

Figura 16. Mejora de la retracción del menisco mediante la introducción del condensador. Sin burbuja de aire (izquierda). Con burbuja de aire (derecha). 16a: agua, 16b: aceite fluorado, 16c: menisco, 16d: burbuja de aire

La presente invención describe por primera vez un método para fusionar o poner en contacto gotitas de reactor y reactivo en un sistema trifásico microfluídico o milifluídico, en el que la gotita de reactivo, inyectada en el tren con

- la ayuda de una entrada lateral llamada inyector, se desprende del depósito de reactivo antes de la coalescencia con la gotita de reactor. Más específicamente, la gotita de reactivo se desprende antes de estar en contacto con la gotita de reactor. El método de la invención implica dos etapas sucesivas pero no concomitantes: producir en primer lugar en el tren una gotita de un reactivo que se desprende antes de la segunda etapa de fusión. Por el método de la invención, se forma una gotita de reactivo *in situ*, cuya formación se puede sincronizar y, si es necesario, puede ser selectiva. La gotita de reactivo se forma *in situ*, la gotita resultante se cuelga en el punto de inyección (entrada lateral) y se separa del depósito de reactivo antes de que la gotita de reactor alcance el punto de inyección.
- Mediante el método de la invención, las gotitas se fusionan sin contaminación, es decir, sin contaminación del depósito y sin contaminación cruzada entre las gotitas, incluso en presencia de microorganismos en las gotitas, y aún más en presencia de hongos.
- El método de la invención puede usarse para fusión activa o pasiva, lo que significa que el uso de electrodos para fusionar gotitas es opcional, y más ventajosamente no se usa electrodo (fusión pasiva). Además, el canal del dispositivo microfluídico o milifluídico puede ser regular. En particular, no comprende geometría de bifurcación en el lugar en el que se añade la gotita de reactivo, y por ejemplo, el canal puede ser un canal redondeado sin geometría de bifurcación.
- El método de la invención puede usarse para trenes regulares o irregulares. En particular, por el método de la invención, se puede operar un tren que comprende reactores que no son equidistantes.
- Micro/milifluídico significa microfluídico o milifluídico. Microfluídica se refiere a sistemas en los que se manejan pequeños volúmenes de fluidos en canales/tubos a escala micrométrica. La milifluídica se refiere a sistemas en los que se manejan pequeños volúmenes de fluidos en canales/tubos a escala milimétrica.
- La invención se refiere a un método para fusionar o poner en contacto gotitas de reactor y de reactivo en un dispositivo microfluídico o milifluídico, que comprende las etapas de
- en el canal de dicho sistema microfluídico o milifluídico, generar un tren micro/milifluídico trifásico que comprende una fase continua, por lo menos dos gotitas de reactor, y por lo menos un tapón de espaciador entre dos gotitas de reactor A_n y A_{n+1} , en el que n es un número entero ≥ 0
 - inyectar con la ayuda de una entrada lateral denominada inyector, en el tren, reactivo en una gotita única no humectante B, en el que dicha gotita B se genera *in situ* durante el paso en el punto de inyección del tapón de espaciador que precede directamente a la gotita de reactor A_{n+1} , en el que la gotita B se desprende del punto de inyección antes de que la gotita de reactor A_{n+1} alcance el punto de inyección con la formación de un menisco de fluido de reactivo en el extremo del inyector, y en el que el menisco de fluido de reactivo se retrae dentro de la entrada lateral cuando la gotita de reactor A_{n+1} está en el punto de inyección;
 - después, fusionar o poner en contacto la gotita B con la gotita de reactor A_{n+1} lejos del punto de inyección
 - cuando $n \geq 1$, repetir las etapas (b) y (c).
- El canal de dicho sistema microfluídico o milifluídico presenta una geometría cilíndrica o plana. En la siguiente descripción, se hace referencia a una geometría cilíndrica, y de este modo se define el tamaño del canal con referencia a su diámetro. Estas referencias deben reemplazarse por la altura y la anchura del canal en el que circula el tren de gotitas para una geometría plana.
- En la presente descripción, se entiende por "punto de inyección" el punto de generación de gotitas B que corresponde a la ubicación del inyector. En adelante, la gotita B asimismo se llama gotita de reactivo.
- En la descripción, las expresiones "gotita de reactivo", "fluido de reactivo" se usan para definir la gotita, respectivamente el fluido, que comprende el reactivo. De forma similar, las expresiones "gotita de reactor", "fluido de reactor" se usan para definir la gotita, respectivamente el fluido, que comprende el reactor.
- El término "tapón" se utiliza para definir una gotita cuyo volumen V es mayor que $\pi D^3/6$, en el que D es el diámetro del tubo en el que circula el tren de gotas para una geometría cilíndrica, o mayor que $\pi HW^2/4$, en el que H y W representan respectivamente la altura y la anchura del canal en el que circula el tren de gotas para una geometría plana.
- En el método de la invención, el sistema micro/milifluídico comprende por lo menos tres fases: la fase continua (2), la fase espaciadora (1) y la fase de gotitas de reactor (3) (figura 5). La zona en la fase continua entre el tapón de espaciador y la gotita de reactivo forma un puente capilar (zona sombreada en la figura 5). En el método de la invención, la fase continua humedece el canal, el espaciador y la gotita de reactivo y de reactor, de modo que los tapones de espaciador y las gotitas de reactivo y/o de reactor están rodeados por una película delgada de la fase

continua y no tocan el canal. El puente capilar está así continuamente unido al otro puente capilar. La presencia de la fase continua cerca de la pared del canal puede deducirse de los límites de los otros dos componentes, que se curvan tangencialmente lejos de la pared del canal en las interfaces tapón de espaciador/gotita de reactor.

5 La presencia de por lo menos tres fases significa que se puede medir una fuerza interfacial y entre, respectivamente, la fase continua/el espaciador, la fase continua/el fluido de reactor, el espaciador/el fluido de reactor. De forma similar, se puede medir una fuerza interfacial entre, respectivamente, la fase continua/el fluido de reactivo, el espaciador/el fluido de reactivo.

10 La gotita de espaciador y las gotitas de reactor están de manera preferida completamente húmedas por la fase continua. La condición en los parámetros de dispersión $S_{ij} = \gamma_{jk} - (\gamma_{ij} + \gamma_{ik})$, en el que $(i,j,k)=(1,2,3)$ se proporcionan en la figura 1 de Torza y Mason, 1970 (Three-Phase Interactions In Shear and Electrical Fields, S. TORZA AND S. G. MASON, Journal of Colloid and Interface Science, vol. 33, No. 1, mayo 1970).

15 Desde el punto de vista químico,

- la fase continua es sustancialmente inmisible con el fluido de la gotita de reactor y con el fluido de la gotita de reactivo

20 • el fluido espaciador es sustancialmente inmisible con la fase continua, el fluido de gotitas de reactor y el fluido de gotitas de reactivo

Una característica importante del método es que, en la etapa b), el fluido de reactivo no es humectante. Esto significa que el fluido de reactivo no humedece las paredes de los canales ni las paredes de inyección.

25 Las etapas b) y c) del método de la invención comprenden preferentemente las siguientes etapas principales posteriores:

30 i) Generación de una gotita de reactivo colgante, es decir, todavía conectada al depósito de reactivo, que presenta un volumen controlado (etapa b)

ii) Desprendimiento de la gotita de reactivo del punto de inyección (etapa b)

35 iii) Puesta en contacto de la gotita de reactivo con la gotita de reactor y a través del drenaje de la fase continua (etapa c)

iv) Fusión de gotitas activa o pasiva (etapa c)

40 El volumen de la gotita de reactivo colgante está determinado por la presión de inyección, que es mayor que la presión implementada para mover el tren.

Las imágenes de las etapas principales de un esquema de fusión autosincronizada preferido se presentan en la figura 6.

45 El método se describe, en este párrafo, con referencia a la figura 6. En esta forma de realización particular, el reactivo se añade por una entrada lateral. La característica de auto-sincronización de esta invención se muestra en las figuras 6a, en la que una gotita de reactivo permanece unida al depósito de reactivo, y forma así una gotita colgante en la entrada lateral hasta que la extremidad del tapón de espaciador alcanza la gotita de reactivo colgante. Después, se produce el desprendimiento, y la gotita de reactivo recientemente formada entra en el puente capilar de fase continua definido por el volumen que separa la punta posterior del tapón de espaciador y la punta frontal de la gotita de reactor (creando así una cámara móvil de fusión pasiva), como se aprecia en la figura 6b. La característica de no contaminación de este método se muestra en la figura 6c, en la que la gotita de reactivo mantiene su integridad después del desprendimiento. Después, la fusión de gotitas se produce lejos del punto de generación de gotitas de reactivo (figura 6d), manteniendo el depósito de disolución de reactivo sin contaminar. En la figura 6c se muestra evidencia adicional de la característica de no contaminación: cuando la gotita de reactor pasa por debajo de la entrada lateral, el menisco de fluido de reactivo experimenta una retracción desde el extremo de la entrada lateral, asegurando que no haya contacto entre la gotita de reactor y el depósito de reactivo.

60 La zona en la fase continua entre el tapón de espaciador y la gotita de reactivo forma un puente capilar. En una forma de realización preferida, la gotita de reactivo permanece unida al punto de inyección y se rompe cuando el puente capilar frente a la gotita de reactor A_{n+1} alcanza la gotita de reactivo.

El método de la invención implica un nuevo mecanismo de formación de gotitas: la tensión interfacial induce la ruptura de la gotita colgante.

65 La gotita de reactivo se desprende cuando la fuerza capilar que actúa sobre la gotita colgante es mayor que la

fuerza capilar que sostiene la gotita colgante. Este mecanismo define el tamaño de gotita de reactivo más pequeño que se puede producir.

5 El volumen mínimo de líquido inyectado es el volumen necesario para obtener una gotita colgante que se romperá. Ventajosamente, el radio mínimo de la gotita de reactivo, r_{\min} se define por la siguiente ecuación: $r_{\min} \sim d \sqrt{\gamma_{12}/\gamma_{23}}$

- en la que d es el diámetro de la entrada lateral (o la anchura o la altura cuando la entrada no es redonda)
- γ_{12} es la tensión superficial entre la fase 1 (reactivo) y la fase 2 (fase continua)
- γ_{23} es la tensión superficial entre la fase 2 (fase continua) y la fase 3 (espaciador)

10 En una forma de realización preferida, el volumen de la gotita B es ventajosamente superior a 5 pl, más ventajosamente superior a 10 pl. En una forma de realización preferida, el volumen de la gotita B es superior a 2

15 nl.

El diámetro máximo será determinado caso por caso por el experto en la materia. En particular, el tamaño máximo de la gotita de reactivo es el tamaño del canal principal para evitar cualquier riesgo de que la gotita inyectada corte el espaciador en dos partes.

20 Cuando el fluido del espaciador es un gas, en particular aire, el diámetro máximo formado por la formación de gotitas inducida por tensión interfacial es principalmente independiente del caudal de la fase continua, y corresponde aproximadamente al tamaño del tubo en el que se mueve el tren. El volumen máximo de fluido que puede inyectarse es el volumen en el que la gotita se convierte en un tapón (es decir, el diámetro de la gotita es superior o igual al diámetro del canal). De hecho, cuando el fluido ya no forma una gotita sino que se convierte en un tapón, existe el riesgo de que el fluido inyectado divida el tapón de espaciador.

Por otro lado, para un espaciador viscoso como el aceite mineral, la gotita colgante puede desprenderse mediante una fuerza viscosa que es una función creciente de la velocidad del fluido, es decir, el caudal de la fase continua. El tamaño crítico de gotita por encima del cual ocurre la ruptura inducida por cizallamiento es inversamente proporcional a la velocidad del espaciador y las viscosidades de las fases continua y del espaciador. Después, la gotita se expulsa desde la ubicación del espaciador y finalmente puede entrar en contacto o fusionarse con la gotita de reactor de una manera libre de contaminación. El experto puede determinar fácilmente el tiempo de retraso entre la formación de gotitas y la expulsión, por ejemplo cambiando la ubicación en la que se induce la fusión activa, así como la ubicación del módulo de detección.

30 El volumen de la gotita inyectada en la etapa b) depende principalmente del tamaño del canal. En una forma de realización particular, el volumen es inferior a 190 nl.

40 En una forma de realización preferida, la relación r/R , en la que r es el radio de la gotita de reactivo y R es el radio del canal (o la mitad de la anchura o la mitad de la altura cuando el canal no es redondo), oscila entre 0.1 y 1, ventajosamente de 0.1 a 0.9, más ventajosamente de 0.2 a 0.7, aún más ventajosamente de 0.25 a 0.60.

45 El diámetro de la entrada lateral, d , (o la anchura o la altura cuando la entrada lateral no es redonda) es pequeño antes del diámetro, D , (o la anchura o la altura cuando el canal no es redondo) del canal. En particular, $d < D$. En formas de realización preferidas, $d/D < 0.5$, en particular d/D oscila entre 0.05 y 0.5.

50 De este modo, d depende del tamaño del canal D . En una forma de realización particular, d es inferior a 200 μm , ventajosamente está comprendido entre 50 μm y 200 μm para condiciones milifluídicas, o está comprendido entre 10 μm y 50 μm para condiciones microfluídicas.

El tamaño de la gotita de reactivo, y por lo tanto el volumen de la gotita de reactivo, se puede variar. De hecho, $r_{\min}/d \approx 1$ (véase figura 12), de este modo $r_{\min}/D \approx d/D$, y $r_{\max}/D \approx 0.5$.

55 En el método de la invención, la presencia del tapón del espaciador es necesaria para este nuevo mecanismo de ruptura y después coalescencia.

El tapón del espaciador presenta una interfaz plana en el punto de inyección. La longitud del espaciador L está preferentemente de acuerdo con la siguiente ecuación:

60
$$L = D + \epsilon d$$

en la que

- D y d son como se definieron anteriormente (o se pueden reemplazar por W , w la anchura o H , h la altura cuando el canal o la entrada lateral no es redonda)

- ε es un número mayor que 2, en particular entre 2 y 100. Este número, que depende de la relación d/D , será ajustado por la persona experta.

5 Más preferentemente, la longitud del espaciador, L , es por lo menos dos veces D , más preferentemente por lo menos tres veces D .

La inyección se produce preferentemente cuando el punto de inyección está delante de una superficie plana del tapón de espaciador. La zona de inyección se representa esquemáticamente en la figura 7: la zona de inyección IZ corresponde a la sección plana del tapón de espaciador, en la que $a \geq D/2$ y $b \geq D/2$.

Ventajosamente, la punta del espaciador es esférica.

Después de la inyección, las gotitas de reactivo generadas permanecen unidas - durante el paso del fluido del espaciador - al extremo del inyector (una entrada lateral en la figura 6a) si el cizallamiento de la película delgada continua es insignificante para producir la ruptura del cuello de la gotita, es decir, cuando la velocidad del espaciador es lo suficientemente baja o la viscosidad del espaciador es baja como para un espaciador de gas. La inspección visual de los videos capturados indica que el desprendimiento de gotitas se produce cuando el puente capilar continuo - formado entre las tres fases - entra en contacto con la gotita colgante de reactivo (figura 6b). La tensión interfacial entre la fase espaciadora y la fase continua proporciona la fuerza necesaria para inducir el desprendimiento de gotitas de reactivo. Después del desprendimiento, el puente capilar continuo actúa como una cámara móvil de fusión de gotitas (figura 6c), que permite el contacto entre las gotitas de reactor y de reactivo, así como el drenaje de la fase continua entre las dos gotitas que es necesario para la fusión de gotitas (figura 6d). Después de la fusión, la fase de reactivo y la de reactor se mezclan entonces gracias al flujo interno inducido por el movimiento de la gotita de reactor (figura 6d).

Durante la etapa b), cuando la gotita de reactor se desprende del punto de inyección, el menisco de fluido de reactivo experimenta una retracción desde el extremo del inyector, asegurando que no haya contacto entre la gotita de reactor y el depósito de reactivo. El menisco de fluido de reactivo se retrae desde el extremo del inyector antes de que la gotita de reactor A_{n+1} alcanza el punto de inyección y todavía se retrae cuando la gotita de reactor A_{n+1} está en el punto de inyección.

Para aumentar la retracción del menisco, se usa preferentemente un dispositivo de inyección que comprende otro fluido compresible y/o comprende un material compresible. Por ejemplo, la cámara del dispositivo de inyección, en adelante denominada cámara de inyección, situada entre el depósito de reactivo y el punto de inyección, puede comprender el fluido de reactivo y aire. Cuando la gotita de reactivo se rompe, se produce el desprendimiento, y el menisco experimenta una retracción desde el extremo del inyector debido al cambio de presión. Este fenómeno se puede enfatizar conectando el dispositivo de inyección a un condensador o una capacitancia: jugando con resistencia/capacitancia, se pueden crear variaciones de presión y enfatizar así la retracción del menisco.

En una forma de realización preferida, la gotita de reactivo se inyecta a través de una entrada lateral que emerge en el canal o tubo en el que circula el tren de gotitas. El dispositivo de inyección es preferentemente un picoinyector o un nanoinyector, pero asimismo puede ser cualquier medio adaptado. Preferentemente, la entrada lateral es un orificio en el canal, y el canal, en ambos lados laterales del orificio, está rodeado por un primer revestimiento que comprende un aceite, dicho primer revestimiento está revestido entonces por un polímero. El polímero puede ser un polímero hidrófilo, tal como un poliacrílico, o un polímero hidrófobo, dependiendo de la naturaleza del fluido de reactivo.

La inyección puede ser continua o discontinua, pero preferentemente es discontinua. Una inyección discontinua permitirá el control del volumen de la gotita de reactivo caso por caso. Además, con una inyección discontinua, se puede escoger la gotita de reactor "diana", y en consecuencia, inyectar solo cuando se solicite. Por lo tanto, antes de la etapa b), el método comprende ventajosamente una etapa para detectar la gotita de reactor A_{n+1} . La gotita de reactor A_{n+1} puede detectarse mediante unos medios de detección seleccionados de entre el grupo que consiste en medios ópticos (tal como haz de láser, fluorescencia, espectroscopía de Raman, formación de imágenes), medios eléctricos (tal como impedancia), medios magnéticos, medios de radiactividad, medios acústicos. Además, el método puede comprender, después de la etapa de detectar la gotita de reactor A_{n+1} pero antes de la etapa c), una etapa de señalar la gotita detectada A_{n+1} y ajustar en consecuencia el volumen de la gotita de reactivo, cuyo volumen es nulo (sin inyección) o superior a 1 pl.

Con una inyección discontinua, el método puede implementarse incluso cuando el tren de gotitas de reactor es irregular. Un tren irregular se define por una variación del tamaño de las gotas y/o la distancia entre las gotas que componen el tren. En el método de la invención, el tren es un tren perfecto o un tren irregular.

En una forma de realización preferida, la inyección de la fase de reactivo es accionada por una válvula, en particular una electroválvula, alineada a la entrada lateral por un colector polimérico, la válvula está conectada al depósito de reactivo. El dispositivo puede comprender además un condensador o una capacitancia, para enfatizar la retracción del menisco, y/o una resistencia, para controlar con precisión el volumen inyectado.

El espaciador puede ser un gas o un líquido inmiscible con las fases de reactivo, de reactor y continua. En una primera forma de realización, el espaciador es un gas seleccionado de entre el grupo que consiste en aire comprimido, argón, nitrógeno, CO₂, o una combinación de los mencionados anteriormente.

5 En esta forma de realización, el fluido de la gotita que contiene el reactivo puede ser un fluido insoluble con la gotita de reactivo, tal como aceite mineral o aceite de silicona. En tal caso, después de la inyección, el sistema es un sistema de cuatro fases. Este tren de cuatro fases sería atractivo para realizar ensayos en los que existen dificultades en la solubilidad de un reactivo particular en la fase de reactor.

10 En una segunda forma de realización, el espaciador es un líquido inmiscible con la fase continua y la fase de reactor y de reactivo, tal como el aceite mineral.

15 Habitualmente, el canal del dispositivo micro/milifluídico está realizado preferentemente en polímero fluorado, y más particularmente de Teflon®. La fase continua comprende preferentemente aceite fluorado, y posiblemente un tensioactivo. El experto en la materia se usa con estos componentes.

20 El experto en la materia seleccionará el fluido de la gotita de reactor y de la gotita que contiene el reactivo caso por caso, dependiendo de la reacción que se espera, sobre la base de su conocimiento técnico. Las gotitas de reactor son gotitas discretas de bajo volumen, a veces gotitas de bajo volumen casi idénticas, que viajan a través del canal a una velocidad común.

Por ejemplo, se pueden usar los siguientes reactivos-reactores:

25 Producción de esporas: Placas de agar de dextrosa de patata

Medio de crecimiento: Peptona-glucosa-sales pH 4.6

30 Actividad enzimática: Kit Bodipy FL EnzChek (en amortiguador de acetato 4.6): Este kit contiene un sustrato de almidón con fluorescencia apagada. Este sustrato es degradado eficientemente por la amilasa, la digestión alivia el apagado, y produce fragmentos altamente fluorescentes. El aumento de la fluorescencia que lo acompaña es proporcional a la actividad de la amilasa, y se puede monitorizar con fluorescencia.

35 Como ejemplos de aplicaciones prácticas para el presente método, se pueden citar química combinatoria, detecciones químicas y biológicas, secuenciación genética. Como ejemplo de detecciones biológicas, se puede citar la detección de microorganismos que produce metabolitos (enzimas, fármacos). De este modo, la invención asimismo se refiere al método para su uso en química combinatoria, detecciones químicas y biológicas, secuenciación genética.

40 El tren trifásico se genera dentro de un tubo de canal mili/microfluídico mediante el uso de una unión en T por métodos conocidos por el experto, los caudales de líquido se controlan con bombas, y la presión de gas con controlador de presión.

45 En una forma de realización preferida, el dispositivo es un dispositivo milifluídico.

La invención asimismo se refiere a un dispositivo milifluídico o microfluídico que comprende:

- 50 - un tubo de canal mili/microfluídico lleno de un tren micro/milifluídico trifásico que comprende una fase continua, por lo menos dos gotitas de reactor, y por lo menos un tapón de espaciador entre dos gotitas de reactor A_n y A_{n+1} , en el que n es un número entero ≥ 0
- una abertura que se abre en dicho canal, dicha abertura está conectada a un depósito que contiene reactivo en fase líquida
- 55 - una válvula que acopla dicho depósito y dicha abertura
- un detector, colocado aguas arriba de dicha abertura.

60 El detector permite la sincronización de la apertura de la válvula con la llegada de la gotita de reactor. En particular, la válvula es una electroválvula. El volumen del agente reaccionante inyectado se controla mediante el tiempo abierto (tiempo de pulsación) de la válvula.

El circuito equivalente del dispositivo milifluídico o microfluídico puede ser como sigue:

65 Dos resistencias R1 y R2 están en serie. La unión entre dichas dos resistencias está conectada a un elemento IC en serie con una resistencia R3.

El elemento IC consta de un condensador C1 y una resistencia R4 dispuestos en paralelo.

El circuito equivalente se representa en la figura 11.

En la siguiente descripción, el dispositivo se describirá con referencia al dispositivo en el que la entrada lateral es un orificio en el canal como forma de realización ilustrativa pero no limitativa. De este modo, la invención asimismo se refiere a un dispositivo milifluídico o microfluídico que comprende un tubo de canal perforado por un orificio, una cámara de inyección formada por el espacio dentro del revestimiento que rodea el canal, en ambos lados laterales del orificio, un depósito de reactivo, y opcionalmente una válvula. Por lo general, el tubo está realizado en Teflon®. El tamaño del orificio es como se describió anteriormente para la entrada lateral.

Preferentemente, el dispositivo comprende una válvula entre el depósito de reactivo y la cámara de inyección. En particular, la válvula es una electroválvula. El volumen del agente reaccionante inyectado se controla por el tiempo abierto (tiempo de pulsación) de la válvula.

El dispositivo comprende además una resistencia entre el depósito de reactivo y la cámara de inyección, más particularmente entre el depósito de reactivo y la válvula. En particular, la resistencia puede ser un tubo delgado de Teflon® que conecta el depósito de reactivo y la cámara de inyección, más particularmente la válvula. La resistencia se usa para proporcionar una gran resistencia al flujo y, de ese modo, para obtener un volumen de gotita añadido constante. En el sistema milifluídico, el tubo presenta, por ejemplo, un diámetro interno de 100 µm a 300 µm, más particularmente 200 µm.

El canal, en ambos lados laterales del orificio, está rodeado por un revestimiento polimérico. El revestimiento asimismo se denomina en la presente memoria un colector. El polímero puede ser cualquier polímero adaptado, y se selecciona por el experto en la materia, sobre la base de su conocimiento técnico, dependiendo de la naturaleza del reactivo. En una forma de realización particular, el polímero es un acrílico. Entre el polímero y el canal, el revestimiento comprende ventajosamente además una fase oleosa. La naturaleza del aceite es preferentemente idéntica al aceite de la fase continua.

El colector se utiliza para alinear el depósito de reactivo y/o la válvula y el orificio. El depósito de reactivo y/o la válvula están alineados y unidos al colector por un medio apropiado, tal como un accesorio de tuerca de montaje.

La cámara de inyección es el espacio dentro del colector alineado con el orificio perforado, en particular entre la válvula y el orificio perforado. El diagrama de circuito equivalente de la cámara de inyección es una resistencia y una capacitancia en paralelo.

En una forma de realización preferida, la capacitancia es el fluido compresible presente en la cámara del dispositivo de inyección.

En otra forma de realización, la capacitancia es una membrana delgada y flexible que actuará como una burbuja de gas artificial. Dicha membrana se puede sellar a un agujero perforado en la cámara.

En otra forma de realización, la capacitancia es un tubo que presenta una pared realizada en un material que presenta un módulo elástico bajo.

El circuito equivalente del dispositivo se representa en la figura 11, en la que R1 y R2 corresponden a la resistencia al flujo del tren de gotitas en ambos lados del punto de inyección, R3 es la resistencia descrita anteriormente, y R4 es la resistencia que surge del flujo del fluido de reactivo a través de la cámara de inyección, mientras que C1 es la capacitancia dentro de la cámara de inyección.

La invención tiene por objeto un dispositivo mili/microfluídico cuyo circuito equivalente se representa en la figura 11.

El dispositivo se describirá a continuación haciendo referencia al dispositivo representado en la figura 8, como una forma de realización ilustrativa pero no limitativa.

De este modo, el dispositivo milifluídico o microfluídico comprende un tubo de canal (figura 8, 1) perforado por un orificio (figura 8, 3), una cámara de inyección formada por el espacio dentro del colector acrílico que rodea el canal (figura 8, 8), en ambos lados laterales del orificio, un depósito de reactivo (figura 8, 2) y una válvula (figura 8, 9).

La invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1: Generación de tren milifluídico trifásico

El tren trifásico consiste en una fase continua (aceite fluorado Novec HFE 7500 + 0.5% v/v de tensioactivo perfluoro-octanol), una gotita de reactor (medio de peptona-glucosa-sales, pH 4.6) y un fluido espaciador (aire o

aceite mineral). El tren se genera dentro de un tubo de Teflon® FEP de 750 µm ID mediante una unión en T, los caudales de líquido se controlan con bombas de jeringa, y la presión de gas con un controlador de presión. Para el tren espaciador de aire, los caudales del aceite fluorado y los medios son de 6.5 y 7.5 ml/h, respectivamente, y la presión del aire es de 1 bar. Para el tren espaciador de aceite mineral, los caudales del aceite fluorado, los medios y el aceite mineral son 5, 5 y 10 ml/h, respectivamente.

Los valores de superficie medidos experimentalmente (método de gotita colgante) son los siguientes:

- γ (HFE+PFO 0.5%)/Aire: 12.5 mN/m +/- 0.5 mN/m
- γ (HFE+PFO 0.5%)/Aceite Mineral : 3.7 mN/m +/- 0.5 mN/m
- γ (HFE+PFO 0.5%)/Agua: 30.5 mN/m +/- 0.5 mN/m

Para la validación experimental del mecanismo de eyección de gotitas, se usa isotiocianato de fluoresceína FITC 1E-04 M como fluido de las gotitas de reactor. Las gotitas de agua se inyectan en trenes milifluídicos con espaciadores de aire o aceite mineral. La inyección se dispara mediante la detección de fluorescencia de gotitas de reactor y se acciona mediante una electroválvula a través de orificios perforados de tres radios diferentes (30, 50 y 90 µm). Rmin es el radio mínimo de gotita que sigue el mecanismo de desprendimiento propuesto, y se determina mediante análisis de imagen de capturas de video del procedimiento de inyección.

Los valores se proporcionan en la tabla a continuación:

Tabla 1

	Aire	Aceite mineral
Radio del orificio (µm)	Rmin	Rmin
30	66	85
50	80	123
90	158	218
Error: ±4 µm en el radio de la gotita, ±2 µm en el radio del orificio		

Gráfico para la predicción del modelo de desprendimiento frente a las medidas del radio de gotita mínimo

Los resultados se proporcionan en la figura 12.

Materiales y métodos

1. Generación del tren de gotitas milifluídico en un tubo de Teflon® FEP de 750 µm ID. (Bombas de jeringa y/o controlador de presión).

Elementos del tren:

- a. Fluido espaciador: Aire comprimido o aceite mineral (longitud por lo menos 3 veces el diámetro interno del tubo)
- b. Fase continua: Aceite fluorado Novec HFE 7500 + 0.5% v/v de tensioactivo perfluoro-octanol
- c. Gotita de reactor: Medio de peptona-glucosa-sales + BodipyFL (altura entre 80 y 85% del diámetro interno del tubo)

2. Inyección de gotita de reaccionante (disolución acuosa de azul de metileno o disolución de amortiguador de acetato (pH 4.5) + BodipyFL). Los elementos del módulo se muestran en la figura 8.

Etapas:

- a. Detección de señal de fluorescencia de la gotita de reactor
- b. Inyección de gotita de reaccionante frente a la gotita de reactor (a través de un orificio perforado en el tubo). Inyección accionada por una electroválvula (tipo VHS, The Lee Co.) alineada al orificio perforado por un colector acrílico (kit de montaje del colector, The Lee Co.). Evaluación mediante capturas de imagen (cámara GuppyPro firewire + objetivo Nikon 10x). Figura 6a.
- c. Fijación de la gotita de reactivo al orificio perforado. Figura 6a.

- d. Sincronización: Desprendimiento de gotitas de reactivo desde el orificio perforado en el puente capilar de fase continua (cámara de fusión pasiva móvil). Evaluación a través de capturas de imágenes. Figura 6b.
- 5 e. Contacto entre la gotita de reactivo y la gotita de reactor en la cámara de fusión pasiva móvil. Evaluación a través de capturas de imágenes. Figura 6c.
- f. Drenaje de fase continua en la cámara de fusión pasiva móvil. Evaluación a través de capturas de imágenes. Figura 6c.
- 10 g. Fusión de gotitas. Evaluación a través de capturas de imagen y monitorización de la señal de fluorescencia. Figura 6d.

Resultados

15 El ensayo de inyección de gotitas de reactivo en trenes milifluídicos con aire (figura 6) y aceite mineral como fluidos espaciadores, ha mostrado las cuatro etapas típicas del esquema autosincronizado: generación de gotitas de reactivo, desprendimiento de gotitas de reactivo de la boquilla, contacto de gotitas, y drenaje de fase continua y fusión de gotitas.

20 Al usar una disolución de azul de metileno como disolución de reactivo, se puede observar el patrón de flujo de mezcla después de la fusión de gotitas.

25 Se obtiene el perfil máximo de fluorescencia de un tren milifluídico después de la adición de una disolución BodipyFL 5x. La ausencia de espacios vacíos indica la dosis en todas las gotitas, mientras que el nivel máximo constante indica un volumen constante de las gotitas añadidas.

Ejemplo de implementación

30 Unas esporas de cepas mutantes de *Aspergillus niger* se diluyen en medio PGS después de la extracción para obtener una DO de 0.000375. Esta concentración permite el encapsulamiento de esporas individuales dentro de las gotitas de reactor de medios PGS. Se produce un tren milifluídico con espaciadores de aire de 3105 gotitas de reactor en un tubo de Teflon® FEP de 30 m de largo (750 μ m ID). Para la generación del tren, los caudales del aceite fluorado Novec 7500 (con 0.5% v/v de tensioactivo de perfluoro-octanol) y los medios PGS son 6.5 y 7.5 ml/h, respectivamente, y la presión del aire es 1 bar. El tren se hace circular en direcciones de ida y vuelta aplicando presión constante (250 mbares). Después de que el tren completo pasa un detector de gotitas por láser, la dirección del flujo del tren de gotitas cambia automáticamente. Para determinar la actividad enzimática después de 30 h de crecimiento fúngico a 30°C, se inyectan 5 nl de gotitas Bodipy FL en cada gotita del tren milifluídico utilizando el módulo de la invención, aplicando una presión de 250 mbares para la circulación del tren, 300 mbares para la adición de gotitas de reactivo, y generando pulsos de 3 ms de apertura de la electroválvula, para un agujero perforado de 50 μ m de radio. Se obtiene un retraso de 45 s entre la adición de gotitas y la detección de fluorescencia al ubicar la separación de los módulos de adición y fluorescencia en 30 cm. Este retraso garantiza la recopilación de un único punto de datos para cada gotita dentro de la sección lineal de la curva de actividad enzimática, como lo demuestran numerosos ensayos preliminares. La señal de fluorescencia del tren añadido se muestra en la figura 9b (aumento). En esta curva, la línea de base corresponde a la señal de las gotitas vacías, mientras que los picos corresponden a la fluorescencia por la actividad de amilasa de las 558 gotitas ocupadas con hongos.

50 Las figuras 9a y 9b indican la alta calidad del módulo de adición, expresada como la intensidad de fluorescencia constante de las gotitas vacías.

La actividad enzimática de la biblioteca mutante de *Aspergillus niger* analizada con el sistema milifluídico se muestra en la figura 10, en la que se obtuvo una diferenciación perfecta entre las gotitas vacías y ocupadas, así como una amplia distribución de la actividad enzimática de la biblioteca.

55 Ejemplo 2: Ejemplo de inyección de volumen variable:

60 Para determinar mediante fluorescencia el volumen de gotita añadido, se añaden gotitas concentradas de fluoresceína en un tren milifluídico formado por gotitas de fluoresceína diluidas, con burbujas de aire como espaciadores. Las condiciones de generación del tren milifluídico son idénticas a las presentadas en el ejemplo 1 anterior. El accionamiento de la electroválvula se basa en la detección de gotitas por fluorescencia. Las gotitas de FITC fluoresceína 1E-04 M se inyectan en cada gotita del tren milifluídico (gotitas de FITC fluoresceína 1E-06 M) usando el módulo de esta invención (radio de orificio perforado: 50 μ m), aplicando pulsos de 10 ms de apertura de la electroválvula (tipo VHS, The Lee Co.), una presión de 150 mbares para la circulación del tren, y presiones variables de 150 a 300 mbares para la adición de gotitas de reactivo. Después de la inyección completa del tren milifluídico, el flujo se invierte para registrar la señal de fluorescencia de las gotitas añadidas. La señal de fluorescencia del tren inyectado se muestra en la figura 13, en la que cada etapa corresponde a una presión

diferente de adición de gotitas de reactivo. El aumento del volumen de gotitas de reactivo con el aumento de la presión se muestra en la figura 14, que corresponde a instantáneas de videos capturados. Un balance de masas permite la cuantificación de la relación de volumen de gotita diana a la de volumen de gotita de reactivo (V_T/V_R) con la expresión $V_T/V_R=(C_F-C_T)/(C_R-C_F)$, en la que C_F , C_T y C_R son las concentraciones de las gotitas añadidas, diana y de reactivo. Dada la proporcionalidad entre la concentración de fluoresceína y la altura del pico de fluorescencia, C_F y C_T corresponden a las alturas de los picos de fluorescencia para las gotitas añadidas y diana. Con $C_R/C_T=100$, los valores calculados para (V_T/V_R) - utilizando el valor promedio de la altura del pico para cada etapa - se representan gráficamente en la figura 15, en función de la adición de gotitas de reactivo a la presión aplicada. Se obtuvieron relaciones V_T/V_R de 98 a 16 en el intervalo de presiones estudiado, destacando la flexibilidad del módulo desarrollado para producir gotitas de reactivo en un amplio intervalo de volúmenes. Esta característica tiene aplicaciones potenciales para la generación de gradientes de concentración dentro de sistemas micro y milifluídicos.

Ejemplo 3: Aumento de retracción del menisco

Para demostrar el aumento de la retracción del menisco mediante la introducción de un condensador en el sistema de inyección, se introduce una burbuja de aire dentro del depósito de reactivo. La posición del menisco después del desprendimiento durante la formación de gotitas de reactivo se registra mediante captura de video. La figura 16 muestra la retracción máxima del menisco bajo flujo continuo de reactivo (agua, presión aplicada de 100 mbares), a través de un orificio de radio de 50 μm , en una corriente de aceite fluorado Novec 7500 + 0.5% v/v de tensioactivo de perfluoro-octanol que fluye a 2.5 ml/h. En comparación con un ensayo paralelo realizado sin la burbuja de aire (figura 16, izquierda) en el que se mantienen condiciones operativas idénticas, la retracción del menisco es mayor cuando la burbuja de aire está presente (figura 16, derecha). Este efecto se debe al aumento en el cambio de presión por la compresibilidad de la burbuja de aire, después de la ruptura de la gotita de reactivo.

REIVINDICACIONES

1. Método para fusionar o poner en contacto gotitas de reactor y de reactivo en un dispositivo microfluídico o milifluídico, que comprende las etapas de
- 5
- (a) en el canal de dicho sistema microfluídico o milifluídico, generar un tren micro/milifluídico trifásico que comprende una fase continua, por lo menos dos gotitas de reactor, y por lo menos un tapón de espaciador entre dos gotitas de reactor A_n y A_{n+1} , en el que n es un número entero ≥ 0 , y en el que la fase continua humedece el canal, el espaciador, la gotita de reactivo y la gotita de reactor, y el espaciador y las gotitas del reactivo y/o del reactor no tocan el canal;
- 10
- (b) inyectar con la ayuda de una entrada lateral denominada inyector, en el tren, reactivo en una gotita única no humectante B, en el que dicha gotita no humectante B no humedece las paredes de canales ni las paredes de inyección, en el que dicha gotita B se genera *in situ* durante el paso en el punto de inyección del tapón de espaciador que precede directamente a la gotita de reactor A_{n+1} , en el que la gotita B se desprende del punto de inyección antes de que la gotita de reactor A_{n+1} alcance el punto de inyección con la formación de un menisco de fluido de reactivo en el extremo de inyector, y en el que el menisco de fluido de reactivo se retrae dentro de la entrada lateral cuando la gotita de reactor A_{n+1} está en el punto de inyección;
- 15
- (c) a continuación, fusionar o poner en contacto la gotita B con la gotita de reactor A_{n+1} lejos del punto de inyección
- 20
- (d) cuando $n \geq 1$, repetir las etapas (b) y (c).
- 25
2. Método según la reivindicación 1, en el que la gotita de reactivo permanece unida al punto de inyección y se separa cuando el puente capilar frente a la gotita de reactor A_{n+1} alcanza la gotita de reactivo.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación r/R , en la que r es el radio de la gotita de reactivo y R es el radio del canal, oscila entre 0.1 y 1.
- 30
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el volumen de la gotita inyectada en la etapa b) es superior a 1 pl.
- 35
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación d/D , en la que d es el diámetro de la entrada lateral y D es el diámetro del canal para una geometría cilíndrica, o D es la altura o la anchura del canal para una geometría plana, oscila entre 0.05 y 0.5.
- 40
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la inyección es discontinua.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la gotita de reactivo es accionada por una válvula, en particular una electroválvula.
- 45
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que antes de la etapa b), la gotita de reactor A_{n+1} se detecta mediante unos medios de detección seleccionados de entre el grupo que consiste en medios ópticos, medios eléctricos, medios magnéticos, medios de radiactividad, medios acústicos.
- 50
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa b) comprende además después de la etapa de detectar la gotita de reactor A_{n+1} pero antes de la etapa c) una etapa de seleccionar la gotita A_{n+1} detectada y ajustar en consecuencia el volumen de la gotita de reactivo, siendo el cual volumen nulo o superior a 1 pl.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el espaciador es un gas o un líquido inmiscible con la fase continua, y la de reactor y la de reactivo.
- 55
11. Método según la reivindicación 10, en el que el espaciador es un líquido inmiscible, tal como aceite mineral.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo es un dispositivo milifluídico.
- 60
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en química combinatoria, exámenes químicos y biológicos, secuenciación genética.
14. Dispositivo mili/microfluídico que comprende:
- 65
- un tubo de canal mili/microfluídico lleno con un tren micro/milifluídico trifásico que comprende una fase continua, por lo menos dos gotitas de reactor, y por lo menos un tapón de espaciador entre dos gotitas de reactor A_n y A_{n+1} , en el que n es un número entero ≥ 0

- una abertura que se abre sobre dicho canal, estando dicha abertura conectada a un depósito que contiene reactivo en fase líquida
- 5
- una válvula que acopla dicho depósito y dicha abertura
 - un detector, colocado aguas arriba de dicha abertura, configurado para detectar la gotita de reactor A_{n+1} antes de inyectar la gotita de reactivo B.
- 10
15. Dispositivo mili/microfluídico según la reivindicación 14, cuyo circuito equivalente es el siguiente:
- dos resistencias R1 y R2 están en serie. La unión entre dichas dos resistencias está conectada a un elemento IC en serie con una resistencia R3;
- 15
- el elemento IC consiste en un condensador C1 y una resistencia R4 dispuestos en paralelo.

FIG. 1

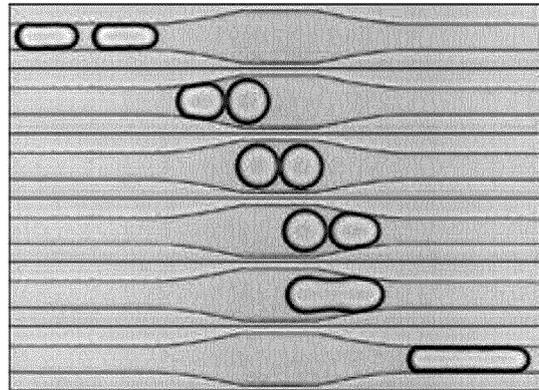


FIG. 2

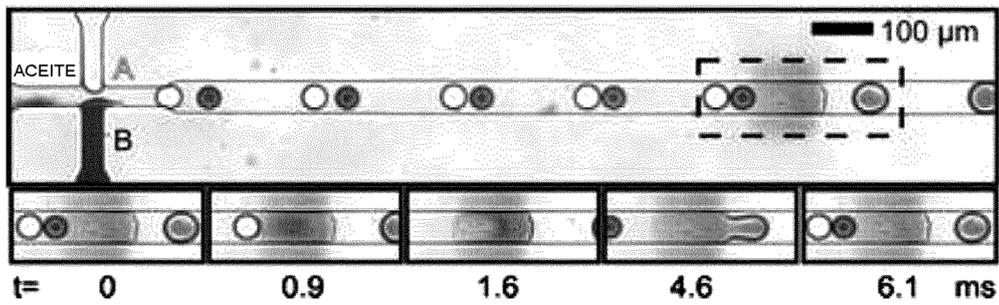


FIG. 3

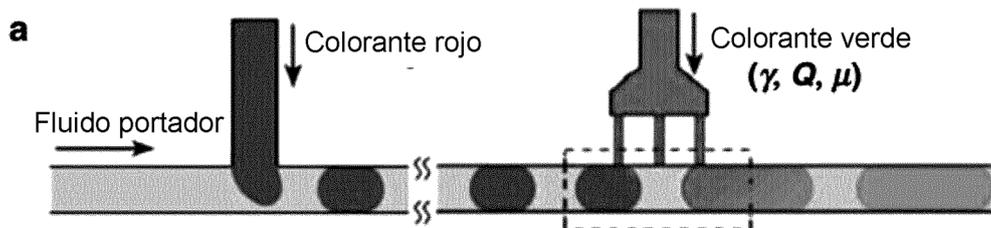


FIG. 4

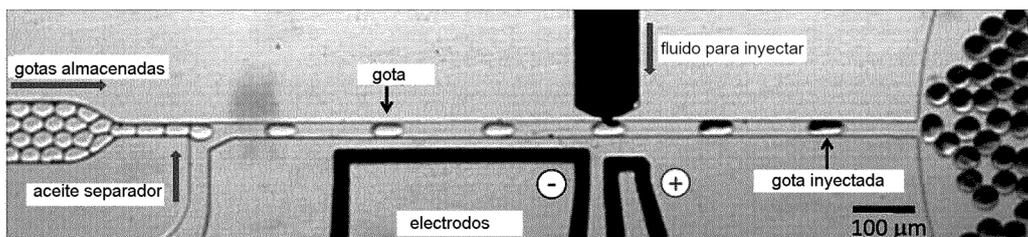


FIG. 5

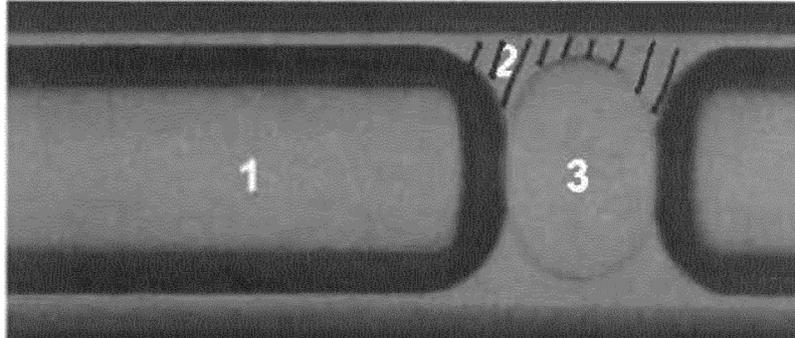


FIG. 6

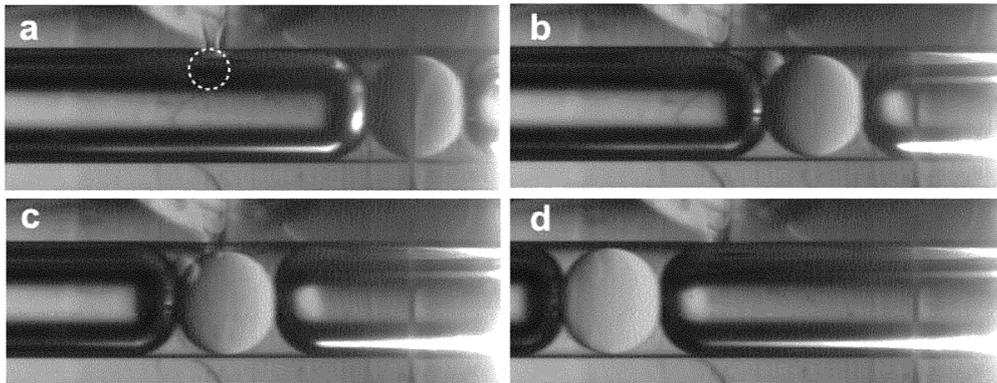


FIG. 9a

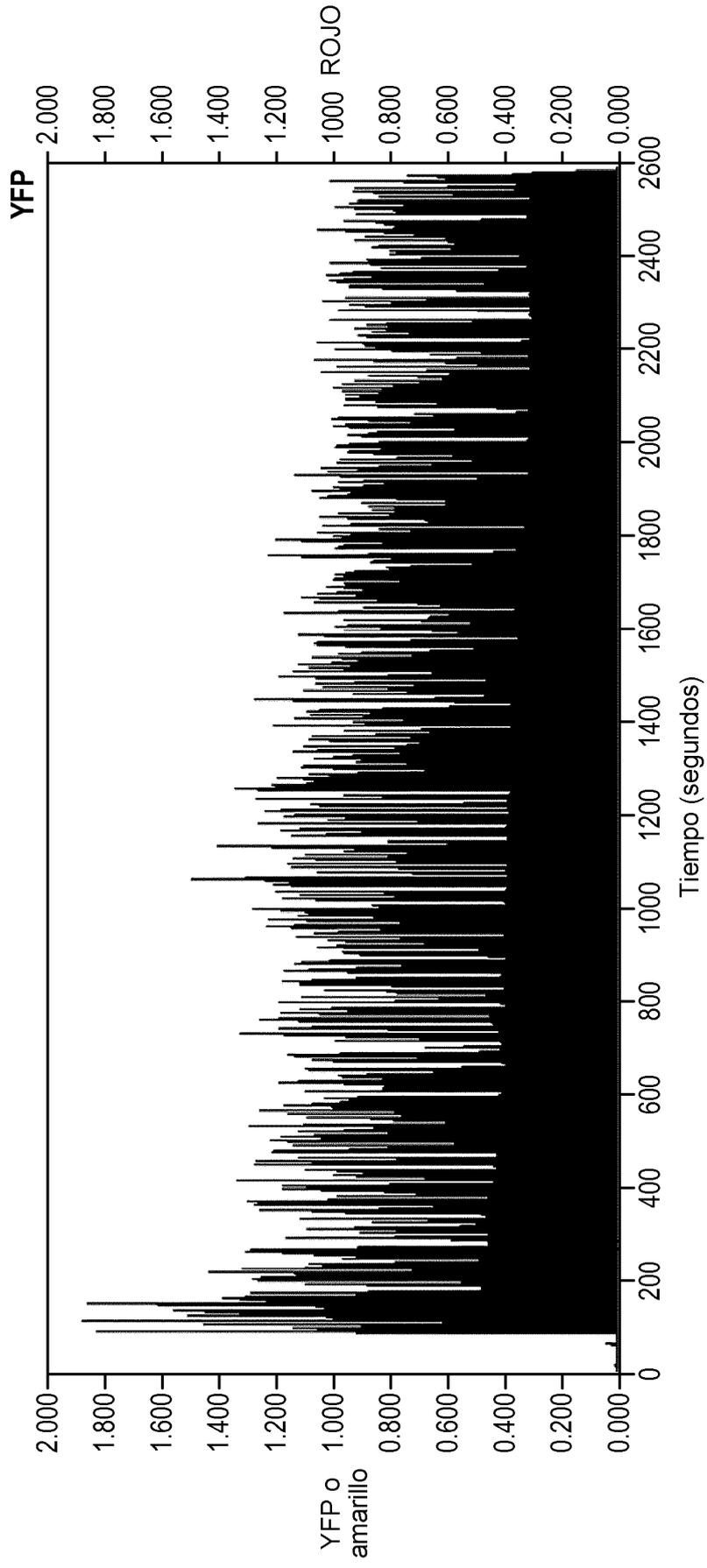


FIG. 9b

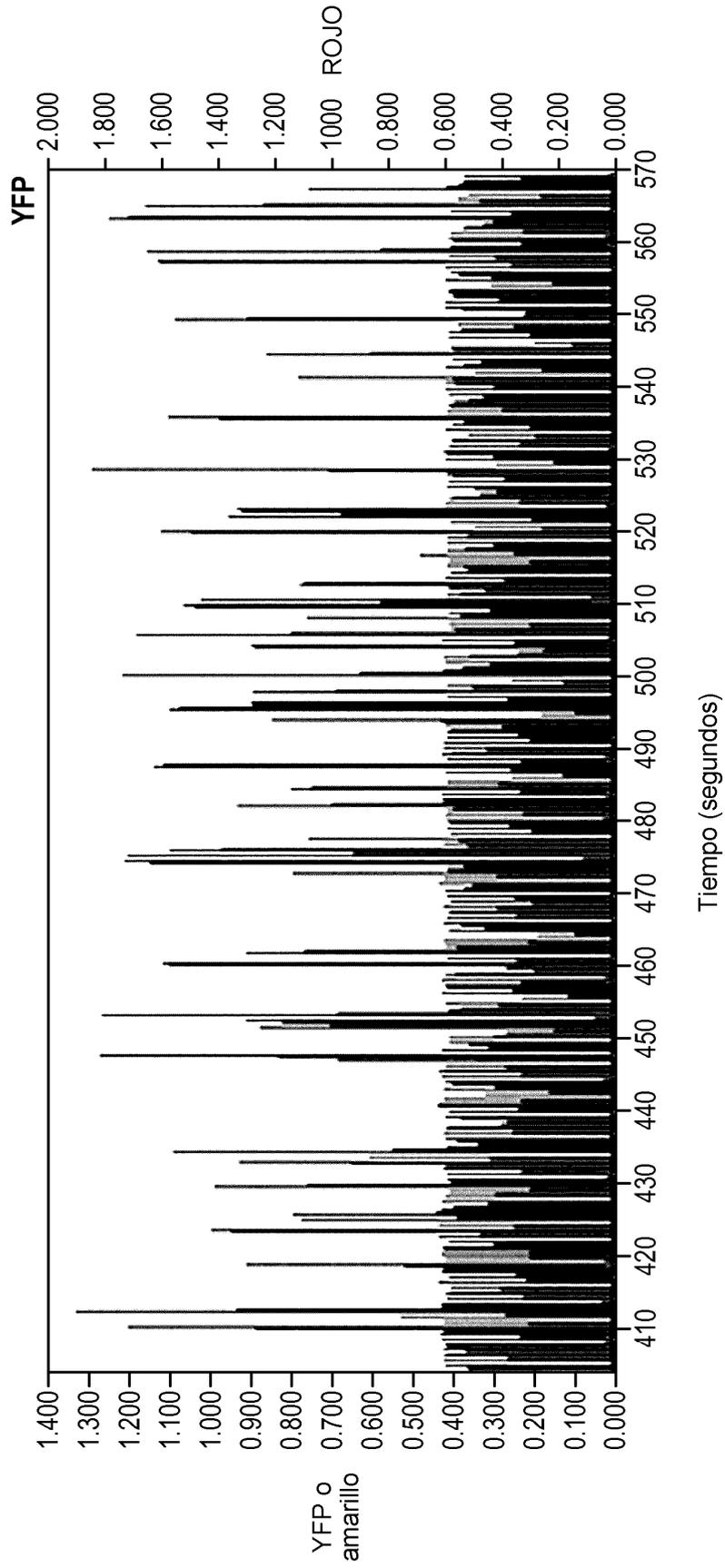


FIG. 10

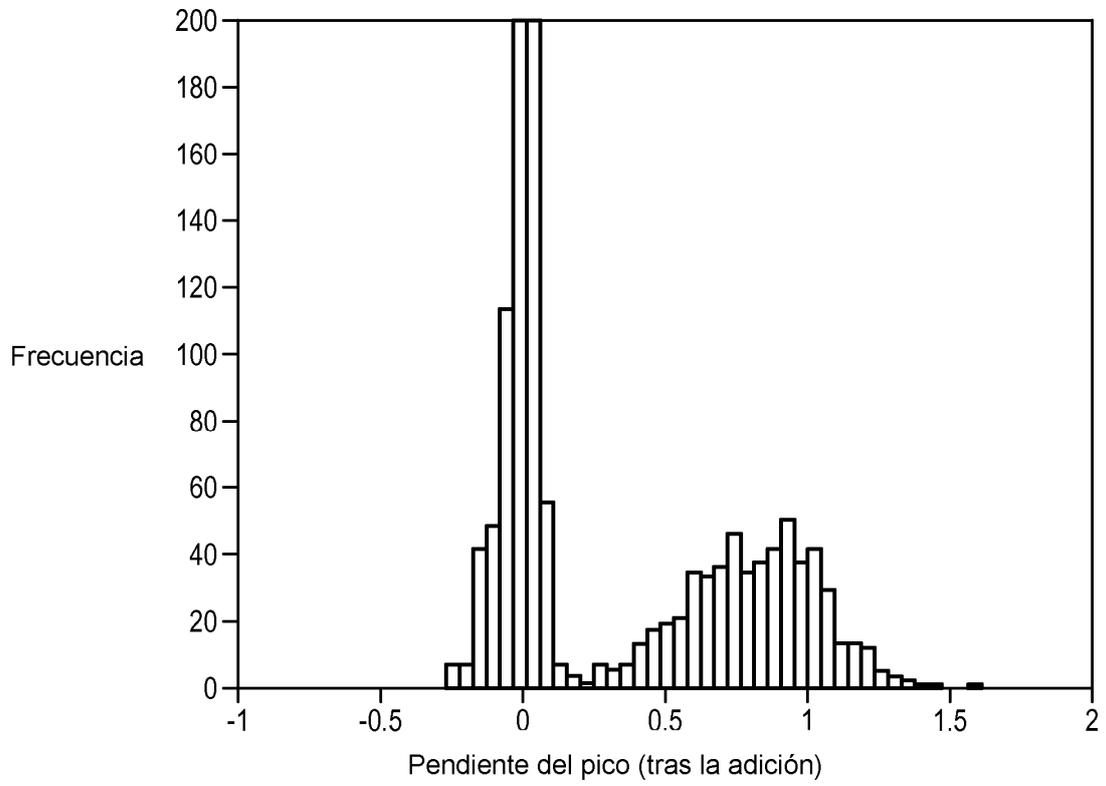


FIG. 11

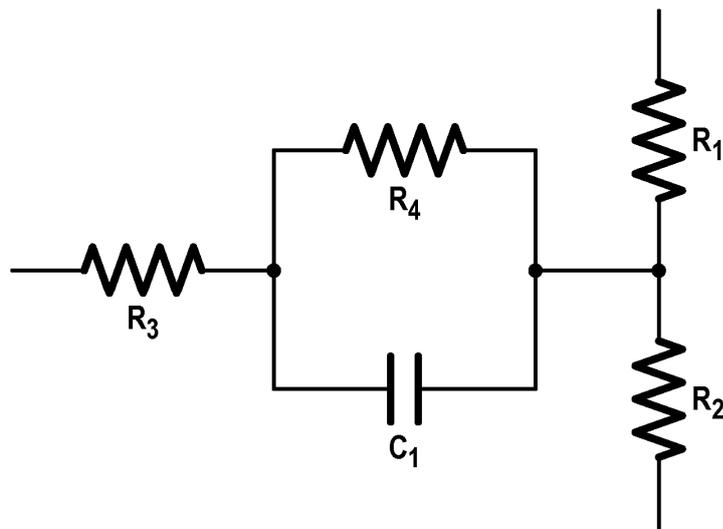


FIG. 12

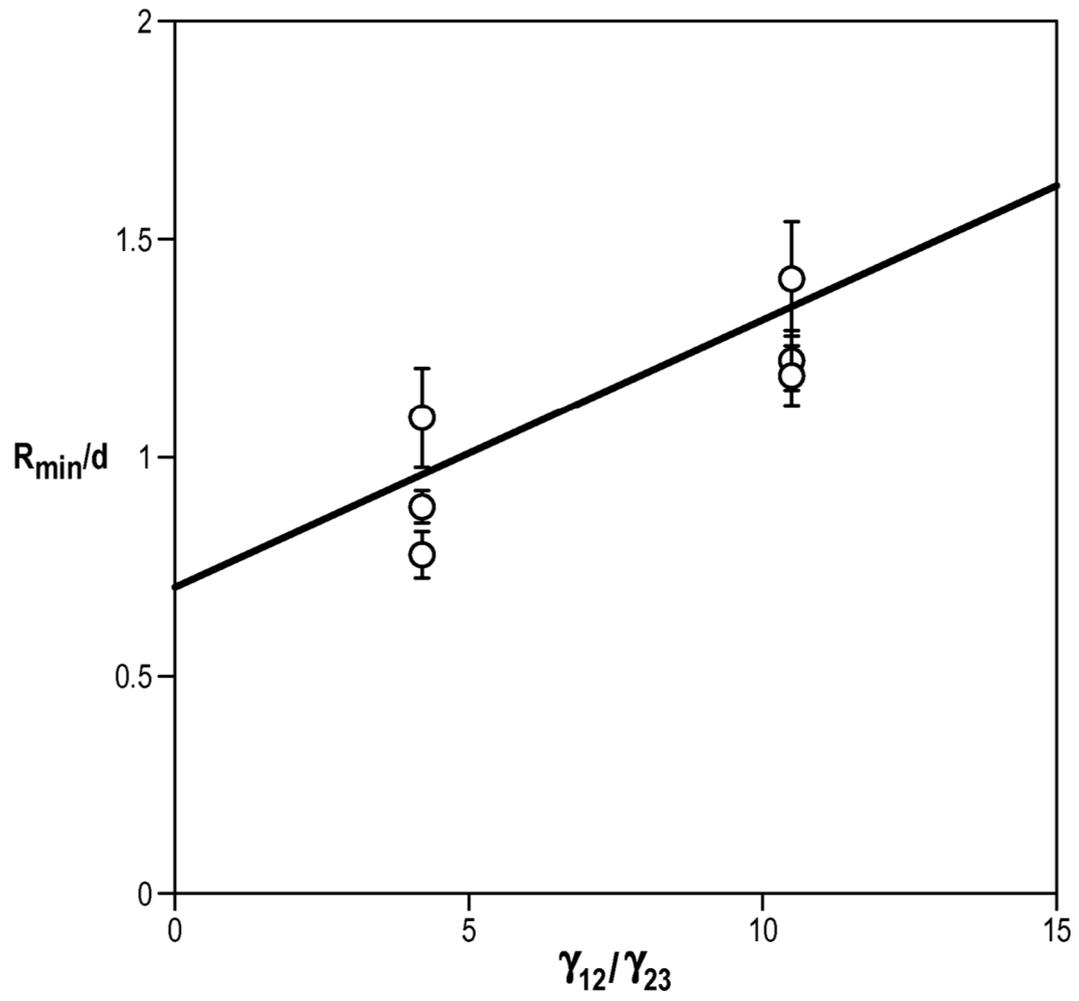


FIG. 13

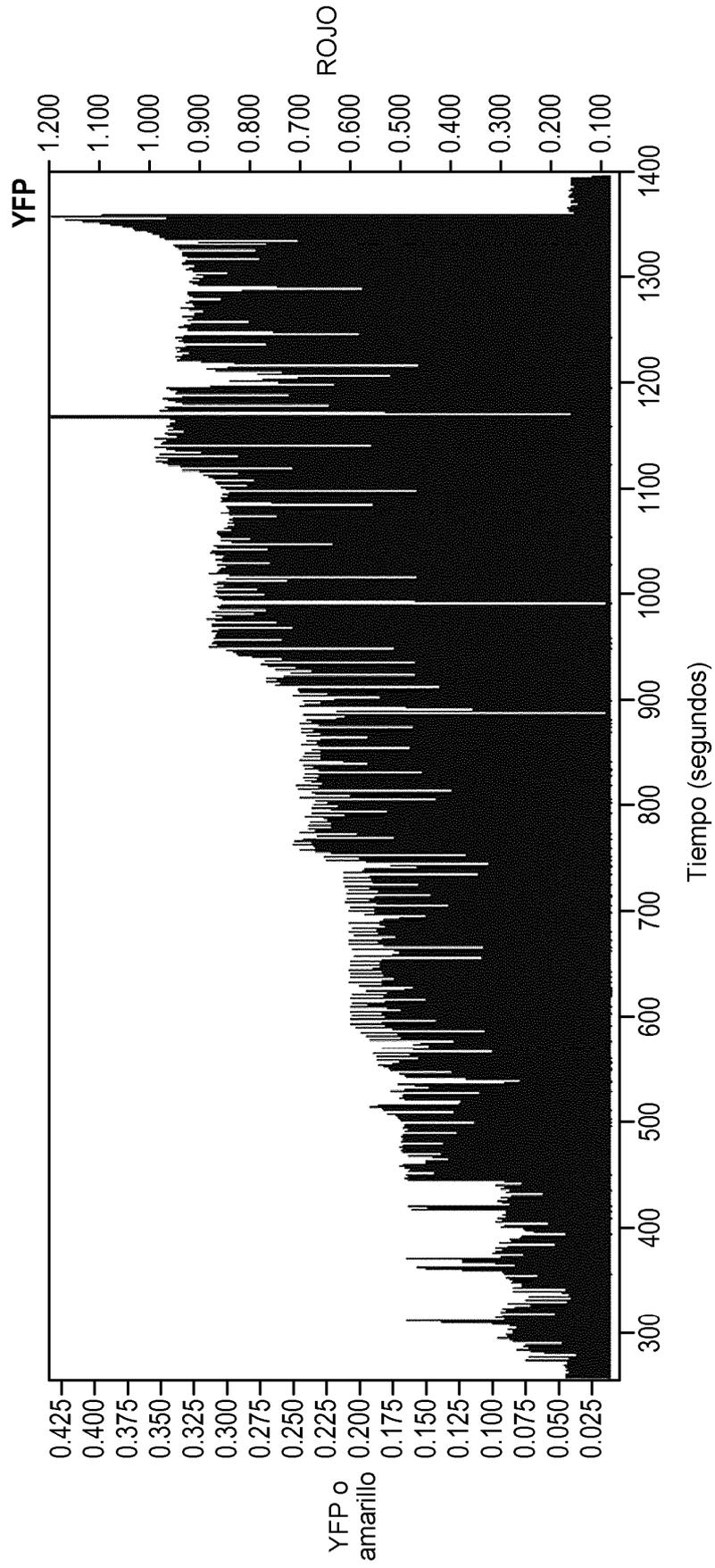


FIG. 14

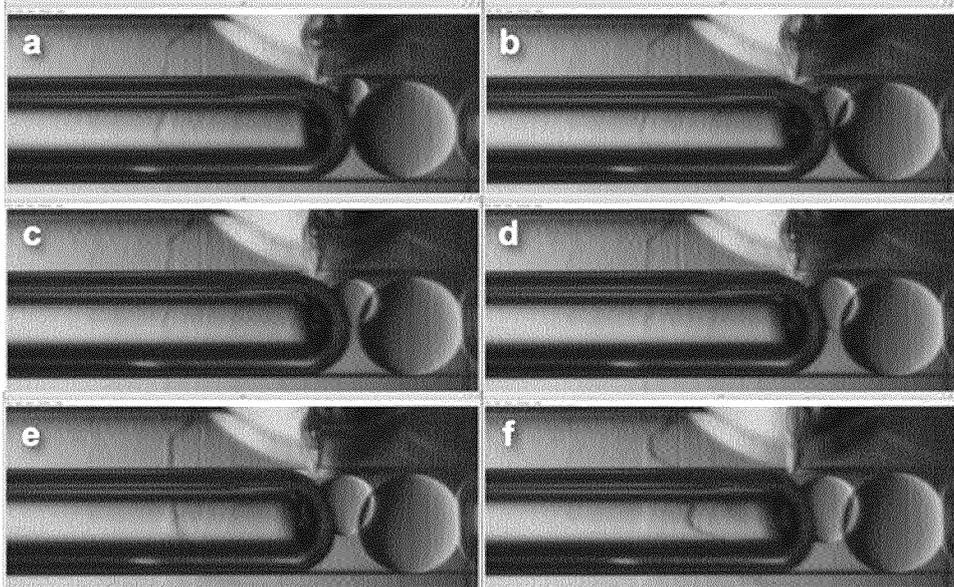


FIG. 15

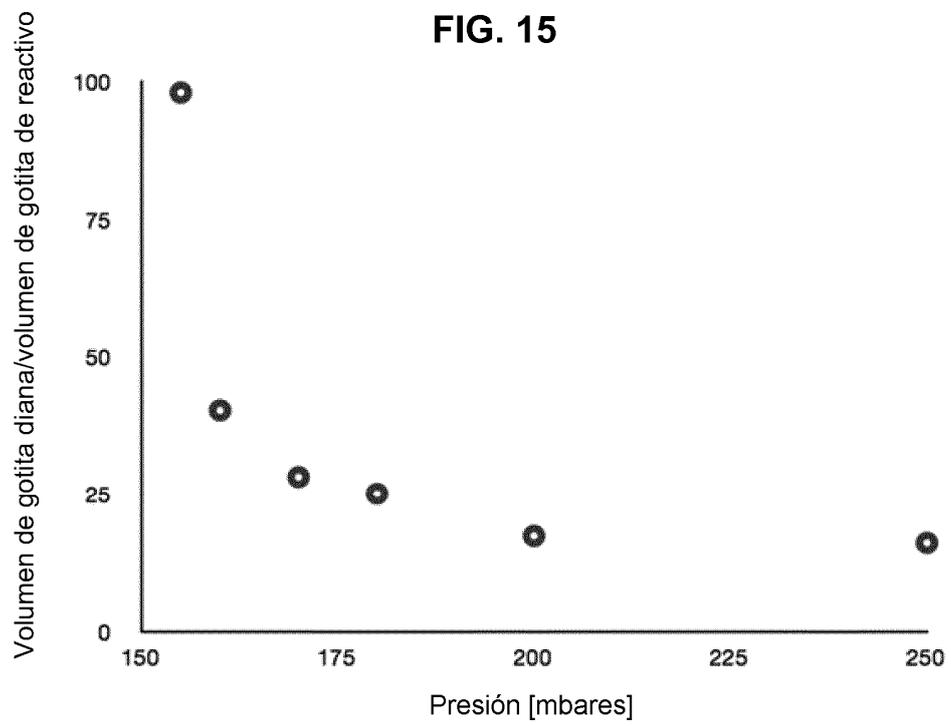


FIG. 16a - 16b

