

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 093**

51 Int. Cl.:  
**G01N 21/77** (2006.01)  
**G01N 25/48** (2006.01)  
**G01N 21/76** (2006.01)  
**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06703280 .5**  
96 Fecha de presentación: **24.01.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1861696**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2007**

54 Título: **Dispositivo de detección química**

30 Prioridad:  
**25.01.2005 GB 0501583**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.10.2012**

73 Titular/es:  
**Vivacta Limited**  
**100 Guillat Avenue Kent Science Park**  
**Sittingbourne**  
**Kent ME9 8GU, GB**

72 Inventor/es:  
**CHARTER, Timothy Joseph Nicholas;**  
**COLIN, Florence;**  
**ROSS, Steven Andrew y**  
**WRIGHT, John Dalton**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 388 093 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

Dispositivo de detección química

La presente invención se refiere a un dispositivo de detección química y, en particular, a un dispositivo de detección química que tiene un transductor y un reactivo luminiscente.

5 La supervisión de analitos, tal como gases en el entorno o compuestos biológicamente importantes en bioensayos, tiene una amplia aplicabilidad. Por consiguiente, se encuentra disponible una gran diversidad de dispositivos analíticos y de diagnóstico. Muchos dispositivos emplean un reactivo que experimenta un cambio de color que puede detectarse visualmente en presencia de la especie que está detectándose. El reactivo se porta con frecuencia sobre una tira de ensayo y puede proporcionarse una óptica para ayudar a la medición del cambio de color.

10 El documento US 4.007.009 da a conocer un procedimiento para el análisis de cationes y aniones en cantidades traza en disolución, mediante excitación con un láser sintonizable de un precipitado o un coprecipitado formado por los iones desconocidos, en presencia de iones que emiten luz con la excitación mediante el láser de colorante, y que experimentan un cambio en los niveles de energía en presencia del ión desconocido en la estructura reticular cristalina.

15 El documento WO 90/13017 da a conocer un elemento transductor piroeléctrico o de otro tipo termoelectrónico en forma de tira. Se proporcionan electrodos de película delgada y se depositan uno o más reactivos en la superficie del transductor. El reactivo experimenta un cambio colorimétrico selectivo cuando éste se pone en contacto con la especie que está detectándose. El dispositivo se inserta a continuación en un detector, en el que el transductor se ilumina desde debajo mediante una fuente de luz LED, y la absorción de luz por el reactivo se detecta como un calentamiento microscópico en la superficie del transductor. La señal eléctrica que se emite a partir del transductor se procesa para deducir la concentración de la especie que está detectándose. Este tipo de sistema se formula típicamente como una divisa desechable sujeta a la ropa de la persona que se está supervisando junto con un lector separado.

20

25 El sistema del documento WO 90/13017 es muy adecuado para proporcionar un historial de exposición. En otras palabras, el usuario de la divisa está expuesto a la especie que está detectándose y entonces, posteriormente, se determina la concentración de la especie a la que ha estado expuesto el usuario. Sin embargo, a pesar de que este sistema es útil en ciertas aplicaciones, es difícil proporcionar una medición continua. Esto es un inconveniente cuando el usuario puede estar expuesto a una especie particularmente peligrosa o, como alternativa, si han de supervisarse unos niveles de oxígeno respirables.

30 Un inconveniente adicional es que, cuando el reactivo se satura, no es posible una detección adicional.

Este sistema está restringido también en el intervalo de analitos que puede detectarse, debido a que sólo pueden detectarse los que experimentan un cambio de color con la combinación con el reactivo.

Por lo tanto, existe una necesidad de un dispositivo de detección química que evite estos inconvenientes.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona un dispositivo de detección química para detectar un analito, que comprende

una fuente de luz,  
al menos un reactivo luminiscente que es capaz de emitir luz cuando se irradia por la fuente de luz, en el que la luminiscencia del reactivo luminiscente puede modificarse por el analito, cambiando de este modo la generación de calor, cambio en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito,  
40 un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y unos electrodos, que es capaz de realizar una transducción del cambio de calor en una señal eléctrica,  
un detector que es capaz de convertir la señal eléctrica en una indicación de la concentración del analito, y en el que el reactivo (5) luminiscente está montado en el transductor (2).

45 Preferentemente, la luminiscencia puede interrumpirse por el analito, aumentando de este modo la generación de calor, aumento en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito.

Como alternativa, la luminiscencia puede potenciarse por el analito, disminuyendo de este modo la generación de calor, disminución en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito.

Preferentemente, el reactivo luminiscente puede interconvertirse entre dos formas químicas que tienen unas propiedades de luminiscencia diferentes mediante reacción o combinación con el analito.

50 Preferentemente, el reactivo luminiscente se adsorbe sobre, se atrapa dentro de o se inmoviliza sobre un material de soporte.

Preferentemente, el reactivo luminiscente es un reactivo fluorescente.

- 5 Preferentemente, el dispositivo de detección química comprende además un reactivo adicional que es capaz de reaccionar con un segundo analito para cambiar la concentración local del primer analito, modificando de este modo la luminiscencia del reactivo luminiscente para proporcionar una indicación de la concentración del segundo analito. En particular, preferentemente el primer analito es oxígeno, el segundo analito es glucosa y el segundo reactivo es glucosa oxidasa.
- Preferentemente, el reactivo luminiscente es una combinación de un componente de absorción de luz y un componente luminiscente, en el que el componente de absorción de luz absorbe luz y entonces excita indirectamente el componente luminiscente mediante una transferencia de energía.
- 10 La presente invención también proporciona un método para detectar un analito, que comprende irradiar al menos un reactivo luminiscente para inducir la luminiscencia,
- 15 exponer el reactivo luminiscente a una muestra, en el que, en presencia del analito, la luminiscencia se modifica mediante el analito, cambiando de este modo la cantidad de calor generado, cambio en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito, realizar una transducción del cambio de calor en una señal eléctrica, usando un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y unos electrodos, y convertir la señal eléctrica en una indicación de la concentración del analito, en el que el reactivo (5) luminiscente está montado en el transductor (2).
- Preferentemente, el analito interrumpe la luminiscencia del reactivo luminiscente, aumentando de este modo la generación de calor, aumento en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito.
- 20 Como alternativa, el analito potencia la luminiscencia del reactivo luminiscente, disminuyendo de este modo la generación de calor, disminución en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito.
- Preferentemente, el analito convierte el reactivo luminiscente de una forma química a otra forma química, en el que las dos formas químicas tienen unas propiedades de luminiscencia diferentes.
- 25 Preferentemente, un segundo reactivo reacciona con un segundo analito para cambiar la concentración local del primer analito, modificando de este modo la luminiscencia del reactivo luminiscente para proporcionar una indicación de la concentración del segundo analito.
- La presente invención se describirá ahora con referencia al dibujo, en el que la figura muestra el dispositivo de detección química de la presente invención (a) en ausencia de un analito y (b) en presencia de un analito.
- 30 La presente invención se basa en el hallazgo, por parte del solicitante de la presente invención, de que puede detectarse una modificación en la luminiscencia de un reactivo luminiscente usando un transductor que es capaz de convertir calor en una señal eléctrica. Tales transductores se conocen bien en la técnica. Preferentemente, el transductor es un transductor de estado sólido. La luminiscencia puede modificarse de varios modos, tal como mediante interrupción de luminiscencia, potenciación de luminiscencia, conversión del reactivo luminiscente de una forma débilmente luminiscente o no luminiscente a una forma luminiscente, o viceversa.
- 35 La figura muestra un dispositivo de detección química de acuerdo con una realización de la presente invención, que se basa en la interrupción de luminiscencia. La figura (a) representa el dispositivo 1 de detección química en ausencia del analito. El dispositivo 1 comprende un elemento 2 piroeléctrico o piezoeléctrico que tiene unos revestimientos 3, 4 de electrodo. El elemento 2 piroeléctrico es, preferentemente, una película de poli(fluoruro de vinilideno) polarizada. Los revestimientos 3, 4 de electrodo se forman preferentemente a partir de óxido de indio y estaño con un espesor de aproximadamente 35 nm, u oro revestido mediante metalización por bombardeo atómico, con un espesor de 5–15 nm. Se deposita un reactivo 5 luminiscente, usando cualquier técnica adecuada, sobre el revestimiento 3 de electrodo superior. El reactivo puede encontrarse en forma de tira y puede depositarse una pluralidad de reactivos. Preferentemente, el reactivo 5 luminiscente se absorbe sobre, se atrapa dentro de o se inmoviliza sobre un material de soporte. Puede usarse cualquier material de soporte adecuado, tal como una matriz de polímero, un vidrio poroso o un vidrio sol–gel. Una característica clave de la presente invención es que el reactivo 5 luminiscente emite luz cuando se irradia mediante una fuente 6 de luz, tal como un LED. La fuente de luz ilumina el reactivo, el cual emite luz entonces, que se indica mediante una flecha de trazos en la figura (a). La fuente 6 de luz se coloca de tal modo que ilumina el reactivo. Preferentemente, la fuente 6 de luz se coloca por debajo del elemento 2 y los electrodos 3, 4, y el reactivo 5 se ilumina a través del elemento 2 y los electrodos 3, 4. En ausencia de un analito, se favorece la desintegración radiativa y, por lo tanto, se genera poco o ningún calor.
- 40
- 45
- 50
- En presencia del analito, tal como se muestra en la figura (b), la luminiscencia del reactivo 5 se interrumpe. Esto se indica en la figura (b) mediante la ausencia de la flecha de trazos. La interrupción de luminiscencia genera calor 7, el cual se irradia en el transductor piroeléctrico o piezoeléctrico. El solicitante de la presente invención ha descubierto que la cantidad de calor 7 generado es proporcional a la concentración del analito. El calor 7 generado mediante la interrupción de luminiscencia somete a esfuerzos al transductor piroeléctrico o piezoeléctrico, lo que genera una carga eléctrica que, a su vez, se detecta mediante el detector 8 usando técnicas conocidas en la materia. El detector 8 proporcionará entonces una indicación de la cantidad de calor generado. Esta puede ser, por ejemplo, una lectura
- 55

de concentración, una alarma audible, etc. El detector debe estar calibrado, por supuesto, antes de su uso, usando técnicas convencionales.

En la figura (a), el reactivo 5 emite luz al iluminarse por la fuente 6 de luz. La luminiscencia es un fenómeno ampliamente estudiado y que se comprende bien. El principio de la luminiscencia es simple, la molécula de reactivo se encuentra en el estado fundamental a temperatura ambiente (debido a la distribución de Boltzmann) y se excita a un nivel de energía más elevado mediante una radiación de una longitud de onda determinada. Una vez que los niveles de energía más elevados están ocupados, se libera energía hasta que la molécula se devuelve a su estado fundamental. En las moléculas luminiscentes, esta energía vuelve a emitirse como luz (desintegración radiativa). En el reactivo de la presente invención, existe poca o ninguna transferencia de calor a la zona circundante durante la luminiscencia. Sin embargo, en presencia del analito (figura (b)), la luminiscencia se interrumpe y la energía se libera como calor en lugar de luz (desintegración no radiativa). La magnitud de la interrupción es proporcional a la concentración del analito y, a su vez, la magnitud de la interrupción es proporcional a la cantidad de calor generado. El transductor 2 convierte este calor en una señal eléctrica, la cual se detecta mediante el detector 8.

Como alternativa, la interacción del analito con el reactivo luminiscente da como resultado una potenciación (en lugar de una interrupción) en la luminiscencia. Por lo tanto, en ausencia del analito (de forma análoga a la de la figura (a)), el reactivo luminiscente es no luminiscente o sólo débilmente luminiscente. Por lo tanto, la absorción de luz por el reactivo débilmente luminiscente o no luminiscente conduce a excitación, seguida de desintegración no radiativa, la cual que genera calor. En presencia del analito (de forma análoga a la de la figura (b)), se potencia la luminiscencia, es decir, se favorece la desintegración radiativa, reduciendo de este modo la cantidad de calor generado. Esta reducción de la generación de calor se convierte en una señal eléctrica por el transductor, la cual se detecta mediante el detector.

En otra realización, el reactivo luminiscente existe en dos formas químicas, una forma luminiscente y una débilmente luminiscente o no luminiscente. El reactivo luminiscente se convierte de una forma a la otra mediante el analito. Por lo tanto, por ejemplo, en una forma, el reactivo luminiscente emite luz en ausencia del analito, pero en presencia del analito éste se convierte en la forma débilmente luminiscente o no luminiscente. Esta modificación en la luminiscencia se detecta mediante el transductor/ detector.

El reactivo luminiscente puede ser fluorescente o fosforescente. Sin embargo, se prefieren los reactivos fluorescentes.

Los varios factores que afectan a la luminiscencia se han investigado bien, y se comprenden bien. En particular, un reactivo luminiscente debe tener un elevado rendimiento cuántico y tener poco o ningún solapamiento entre la absorción y la emisión. Véase, por ejemplo, "Principles of Fluorescence Spectroscopy" J. R. Lakowicz, 1999, Kluwer Academic / Plenum Press, Nueva York.

En la técnica se conocen muchos reactivos luminiscentes que pueden usarse en el dispositivo de detección química de la presente invención. Típicamente, estos reactivos son complejos de metal, compuestos (poli)aromáticos y actínidos.

Los complejos de metal emiten luz debido a la transferencia de carga metal a ligando (TCML) (las transiciones d-d son normalmente débiles debido a que éstas están prohibidas). Por consiguiente, el ligando debe ser capaz de aceptar fácilmente una cierta densidad de electrones. Las bandas de TCML deben ser también de una energía lo bastante elevada para hacer el trayecto radiativo estadísticamente importante. Además, no debería haber ninguna banda d-d de baja altitud, la cual puede vaciar el estado de TCML e interrumpir la emisión. Por lo tanto, el parámetro de desdoblamiento de campo cristalino,  $\Delta_0$ , debería ser lo bastante grande para colocar las bandas d-d por encima de las bandas de TCML en el diagrama orbital molecular. Finalmente, se prefiere un número atómico elevado, debido a que el acoplamiento espín-orbital aumenta la probabilidad del trayecto radiativo, y el acoplamiento espín-orbital aumenta con el número atómico.

Un complejo de metal de este tipo puede representarse mediante la fórmula:



en la que

M representa un ión metálico de un estado de oxidación I-IV de la 2ª o la 3ª columna del bloque d de la tabla periódica y, en particular, Ru, Rh, Pd, Os, Ir o Pt,

L representa un ligando monodentado o polidentado neutro o cargado, que tiene una banda de TCML de una energía más baja que cualquiera de las transiciones d-d de ión metálico y es capaz de aceptar electrones a partir de ión metálico en la banda de TCML y volver a emitir la energía mediante un trayecto radiativo, y y es 1 a 6, y cuando y es mayor que uno, los ligandos pueden ser iguales o diferentes.

Cuando el complejo en conjunto está cargado, se encuentran presentes contraiones. Los contraiones no son materiales, pero deberían seleccionarse para proporcionar las propiedades físicas requeridas, tales como solubilidad. Por supuesto, los contraiones no deben interferir con los procesos de interrupción o fluorescencia.

Con el fin de emitir luz, los compuestos (poli)aromáticos deben tener una separación HOMO–LUMO de una energía apropiada, tener una transición  $\pi$ – $\pi^*$  admisible y ser lo bastante rígidos para inhibir una desintegración no radiativa.

Los actínidos deben tener un gran acoplamiento espín–orbital y tener cromóforos orgánicos, tal como los ligandos anteriormente definidos como “L”, que fácilmente sensibilizan la luminiscencia.

- 5 Claramente, la naturaleza exacta del reactivo luminiscente depende de la naturaleza del analito que se está supervisando. Con el fin de poder detectarse usando el dispositivo y procedimiento de la presente invención, el analito debe ser capaz de modificar la luminiscencia del reactivo luminiscente.

10 Las combinaciones de los analitos y los reactivos luminiscentes que modifican su luminiscencia se conocen bien y, por lo tanto, pueden elegirse unos reactivos luminiscentes apropiados para su uso con un analito particular entre las bibliotecas de materiales que se conocen en la técnica. Por lo tanto, no es necesario proporcionar una lista exhaustiva de compuestos químicos en el presente documento. Sin embargo, se indica a continuación una serie de compuestos que ejemplifican el reactivo luminiscente y el analito de la presente invención.

15 El dispositivo de detección química de la presente invención puede usarse para detectar los niveles de oxígeno. Se conoce que el oxígeno molecular interrumpe la luminiscencia de una serie de compuestos. Esto es particularmente importante, por ejemplo, cuando el usuario del dispositivo está trabajando bajo tierra, tal como en alcantarillas.

Los reactivos luminiscentes adecuados para supervisar el oxígeno incluyen, por ejemplo, complejos de rutenio–trisbipiridil ( $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ), fluoranteno, tetrafenilpofirina y pireno.

20 En ausencia de oxígeno, el complejo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  emite luz cuando se excita a 470 nm con un LED azul. La excitación pasa un electrón d de metal a un orbital  $\pi^*$  del ligando. La emisión tiene lugar a partir de las bandas de TCML, que se encuentran a una energía inferior a la de la banda d–d, éstas mismas inferiores a la banda  $\pi$  –  $\pi^*$ . El salto de energía entre la banda de TCML y el nivel de energía del estado fundamental es suficiente para que tenga lugar la fluorescencia. La luz absorbida vuelve a emitirse y existe poca o ninguna transferencia de calor a la matriz circundante y, por lo tanto, no se obtiene señal alguna. En presencia de oxígeno, la fluorescencia del complejo se interrumpe y se libera energía como calor a la matriz. Puede detectarse entonces una señal.

25 La concentración de iones ferrosos en, por ejemplo, el agua subterránea, puede determinarse usando el presente dispositivo, empleando Azul de Calceína como reactivo luminiscente. El Azul de Calceína (ácido 4–metilumbeliferona–8–metiliminodiacético) emite luz con la excitación con luz de una longitud de onda apropiada y esta fluorescencia se interrumpe mediante iones de hierro(II). Por consiguiente, el Azul de Calceína se monta en el transductor y la interrupción de fluorescencia mediante la sal de hierro(II) se detecta mediante el cambio de calor debido a la interrupción de fluorescencia. La fluorescencia de H2tpp (5,10,15,20–tetrafenilpofirina) se interrumpe en presencia de iones de  $\text{Hg}^{2+}$  y, por lo tanto, puede usarse H2tpp en el dispositivo de detección de la presente invención para supervisar los niveles de sales de mercurio tóxicas en el entorno.

30 El presente dispositivo puede usarse también en ensayos bioquímicos. Por ejemplo, la albúmina de suero bovino (BSA) puede detectarse empleando Rojo de Magdala (MR) como reactivo fluorescente. El MR presenta una intensa fluorescencia con la excitación a 348 nm, y esta fluorescencia se interrumpe mediante BSA.

El dispositivo es capaz también de detectar explosivos de nitrato o sus residuos. Los explosivos de nitrato, tal como 2,4,6–trinitrotolueno (2,4,6–TNT), hexahidro–1,3,5–trinitro–1,3,5–triazina (RDX), octahidro–1,3,5,7–tetranitro–1,3,5,7–tetrazina (HMX), nitrometano y nitrato de amonio, interrumpen la fluorescencia de hidrocarburos poliaromáticos tal como pireno y, por lo tanto, pueden usarse en el dispositivo de la presente invención.

40 Pueden detectarse di– o trinitrofenoles basándose en la interrupción de fluorescencia del diclorhidrato de 3,3',5,5'–tetrametilbenzidina (TMB–d). El TMB–d emite una intensa fluorescencia en la región UV. Un estado fundamental no fluorescente se forma mediante la desactivación por colisión por di– o trinitrofenoles.

45 Se conocen muchos otros ejemplos de interrupción de fluorescencia. Por ejemplo, el oxígeno molecular interrumpe la mayor parte de fluoróforos; las aminas interrumpen hidrocarburos aromáticos no sustituidos mediante transferencia de carga; indol, carbazol y derivados de los mismos son sensibles únicamente a la interrupción mediante hidrocarburos clorados y mediante aceptores de electrones, tal como protones, histidina, cisteína, nitrato, fumarato, Cu(II), Pb(II), Cd(II) y Mn(II); indol, triptófano y derivados de los mismos se interrumpen mediante succinimida, dicloroacetamida, clorhidrato de piridinio, clorhidrato de imidazolio, metionina, Eu(III), Ag(I) y Cs(I); FAD (flavina adenina dinucleótido) y NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducida) se interrumpen mediante adenina; los agentes de interrupción biológica incluyen purinas, pirimidinas, y N–metil–nicotinamida; y xenón, peróxido de hidrógeno, acrilamida, ión perbromato, ión yoduro, óxido nitroso, nitrometano, nitróxidos, alquenos, hidrocarburos saturados con impedimento estérico y sustancias que contienen halógeno, especialmente cloroformo, tricloroetanol, bromobenceno y cloruro metilmercúrico son analitos de interrupción bien conocidos.

55 Puede emplearse también una potenciación (en lugar de una interrupción) de fluorescencia. La morina (2',3,4',5,7–pentahidroxiflavona) emite luz débilmente con la excitación a 420 nm. Sin embargo, esta fluorescencia se potencia mediante la presencia de iones de  $\text{Al}^{3+}$ . Por consiguiente, la morina puede usarse en el dispositivo de la presente

invencción para detectar sales de aluminio. La morina se monta en el transductor y se ilumina de tal modo que emite luz débilmente. Por consiguiente, se emite energía mediante desintegración no radiativa, es decir, se genera calor. En presencia de iones de  $Al^{3+}$ , se potencia la fluorescencia (es decir, favoreciendo la desintegración radiativa frente a la no radiativa), reduciendo de este modo la cantidad de calor generado. Se detecta esta reducción de calor generado, dando la concentración de iones de  $Al^{3+}$ .

Puede emplearse también la interconversión de formas luminiscentes y débilmente luminiscentes o no luminiscentes.

Por ejemplo, puede usarse terbio(III) para detectar los anestésicos locales benzocaína y procaína. En ausencia de estos anestésicos, el terbio(III) no produce una luminiscencia significativa. Sin embargo, estos anestésicos liberan ácido p-aminobenzoico después de una etapa de hidrólisis en un medio alcalino, el cual reacciona con el terbio(III) para dar un quelato luminiscente. Por consiguiente, en ausencia del producto de hidrólisis de los anestésicos, la absorción de luz por el complejo de terbio(III) genera calor mediante desintegración no radiativa. En presencia del producto de hidrólisis de los anestésicos, la absorción de luz por el quelato de terbio(III) proporciona luminiscencia y, por lo tanto, se reduce el calor generado. Esta reducción de calor es una función de la concentración de estos anestésicos presentes.

En otro ejemplo, el reactivo luminiscente es un indicador de pH, en el que el ácido o la base, pero no ambos, es luminiscente. Con la conversión a la forma no luminiscente, la absorción de luz por el compuesto no luminiscente se detecta como calor. El grado de conversión a la forma no luminiscente puede usarse después para determinar el pH de la muestra que está detectándose. Un reactivo adecuado es el 1-hidroxipireno-3,6,8-trisulfonato (HPTS).

Como alternativa, el reactivo se selecciona de tal modo que la luminiscencia depende del contenido en agua local, de tal modo que el dispositivo puede usarse para determinar la humedad.

De forma análoga, el reactivo luminiscente es un receptor molecular que tiene un fluoróforo unido covalentemente, cuya eficiencia de fluorescencia cambia dependiendo de su posición en relación con la cavidad activa del receptor molecular y que puede desplazarse con respecto a esta cavidad activa mediante el analito, por ejemplo, un grupo dansilo unido a  $\beta$ -ciclodextrina, cuya fluorescencia disminuye en presencia de moléculas hidrofóbicas pequeñas, tal como ciclohexano y tolueno.

En los sistemas que se describen anteriormente, la luminiscencia se modifica directamente por la presencia de la especie de analito. Como alternativa, puede usarse una modificación de luminiscencia en conjunción con una reacción secundaria para detectar un segundo analito (el analito "objetivo"), que no modifica directamente por sí mismo la luminiscencia del reactivo luminiscente en ningún grado significativo. En su lugar, el segundo analito reacciona, o se combina de otro modo, con el primer analito o el reactivo luminiscente, para afectar a la capacidad del analito de modificar la luminiscencia.

Por ejemplo, un detector de glucosa emplea el sistema  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ / oxígeno, así como un reactivo adicional que reacciona con la glucosa (el segundo analito) para reducir la concentración de oxígeno local, por ejemplo glucosa oxidasa. La reducción de la concentración de oxígeno se detecta mediante el detector, el cual, a su vez, proporciona una indicación de la cantidad de glucosa presente. Por lo tanto, la concentración de glucosa en una muestra se determina usando la interrupción de fluorescencia del oxígeno.

Como alternativa, el segundo analito reacciona y produce un cambio del pH (por ejemplo, la hidrólisis catalizada por ureasa de urea para generar amoníaco), y este cambio del pH se detecta mediante el detector.

En otra realización, el reactivo luminiscente es una combinación de un componente de absorción de luz y un componente luminiscente, en el que el componente de absorción de luz absorbe luz y entonces excita indirectamente el componente luminiscente mediante una transferencia de energía. Esta transferencia de energía por la molécula de absorción de luz se estimula por la presencia del analito. La molécula de absorción de luz absorbe tal luz sin transferencia de energía en ausencia del analito y, por lo tanto, no da fluorescencia, sino que absorbe luz con transferencia de energía en presencia del analito.

Existe también un número considerable de bioensayos que usan cambios en la fluorescencia como procedimiento de detección. El presente dispositivo se presta particularmente a su uso en inmunoensayos y ensayos basados en ácido nucleico.

En una forma de inmunoensayo, se genera un anticuerpo frente al antígeno que va a medirse. Se prepara también una versión fluorescente del antígeno, la fluorescencia de la cual se interrumpe con la unión al anticuerpo. Se toma a continuación una muestra que contiene una cantidad no conocida del antígeno no marcado que está detectándose. A continuación, se mezcla la totalidad de los tres componentes (anticuerpo, antígeno marcado y muestra). Si la muestra contiene una gran cantidad de antígeno no marcado, entonces éste se unirá principalmente al anticuerpo y el antígeno marcado permanecerá en disolución, dando una elevada fluorescencia. Como alternativa, si existe muy poco antígeno en disolución, entonces el antígeno marcado se unirá al anticuerpo, lo que conduce a la interrupción de la fluorescencia del antígeno. El grado de la interrupción se usa como una medida indirecta de la cantidad de antígeno (es decir, el analito) en disolución, usando una curva de calibración preparada previamente. En el

dispositivo de la presente invención, el antígeno fluorescente se monta en el transductor.

5 Otras variaciones de este tipo de ensayo se conocen bien, véase, por ejemplo, "The Immunoassay Handbook, 2ª Ed." David Wild, Ed., Nature Publishing Group, 2001. La modificación de fluorescencia se conoce bien también en el campo de los ensayos de ácido nucleico. Un ejemplo es el colorante Verde de SYBR, que se usa como una medida del ADN bicatenario. Este colorante emite luz cuando se une a ADN bicatenario, pero no cuando se encuentra en disolución libre.

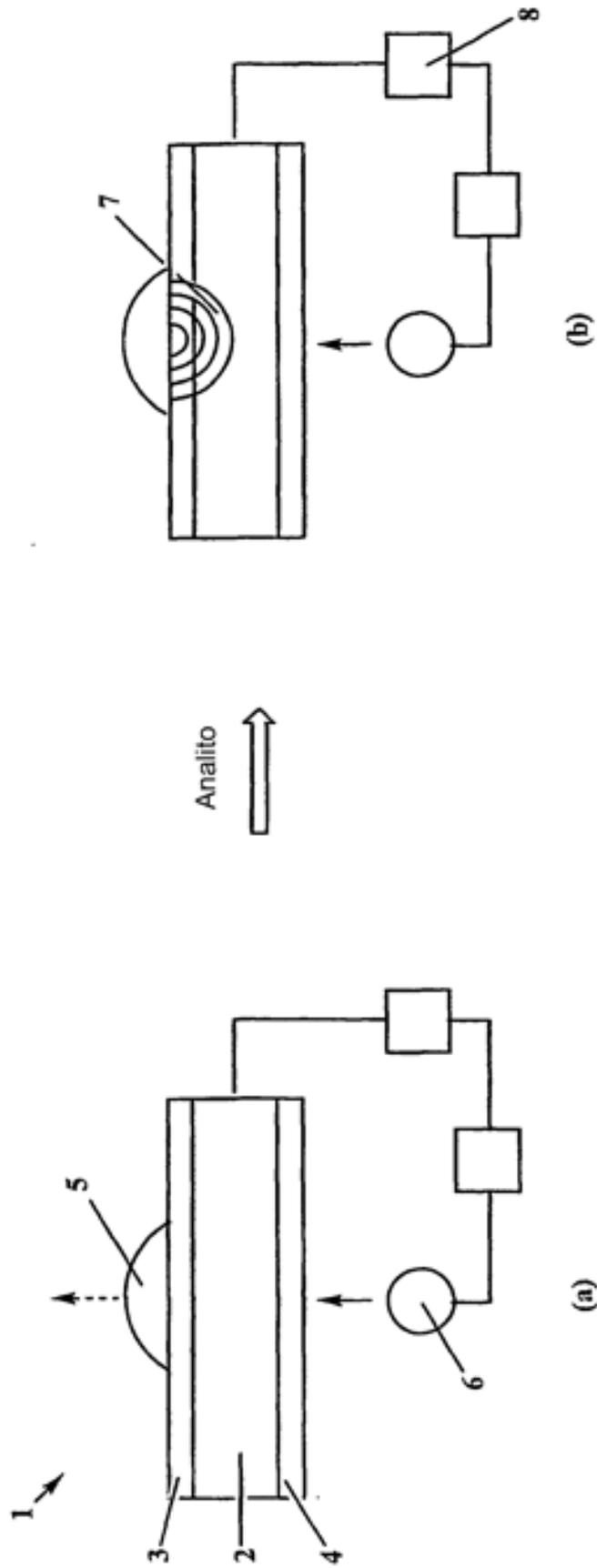
10 La PCR cuantitativa en tiempo real con colorante Verde de SYBR se ha usado para desarrollar unos ensayos de diagnóstico fiables y simples para detectar mutaciones genéticas, incluyendo duplicaciones y deleciones en genes de mosquito con resistencia a fármacos, traslocaciones de cromosomas en genes de enfermedad humana y sustituciones de bases. Ésta se ha usado también para la identificación inequívoca de patógenos víricos, bacterianos o fúngicos. El procedimiento se ha usado con éxito también para PCR de transcripción inversa cuantitativa.

15 Otros ejemplos incluyen "balizas moleculares", que son sondas de oligonucleótido que emiten fluorescencia cuando se hibridan con una secuencia objetivo de ADN o ARN. Estas sondas experimentan un cambio en su conformación cuando se hibridan con su objetivo. Véase, por ejemplo, "Semiautomated clone verification by real-time PCR using molecular beacons" van Schie RC, Marras SA, Conroy JM, Nowak NJ, Catanese JJ, de Jong PJ. Biotechniques 29, 1296–1300 (2000); "Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons" Vet JA, Majitia AR, Marras SA, Tyagi S, Dube S, Poiesz BJ, Kramer FR. Proc Natl Acad Sci USA 96, 6394–6399 (1999); y "Quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods" Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gom V, Singer MJ, Reed MW. Anal Biochem 285, 194–204 (2000).

20

## REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (1) de detección química para detectar un analito, que comprende una fuente (6) de luz, al menos un reactivo (5) luminiscente que es capaz de emitir luz cuando se irradia por la fuente de luz, en el que la luminiscencia del reactivo luminiscente puede modificarse por el analito, cambiando de este modo la generación de calor (7), cambio en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito, un transductor que tiene un elemento (2) piroeléctrico o piezoelectrico y unos electrodos (3, 4), que es capaz de realizar una transducción del cambio de calor en una señal eléctrica, un detector (8) que es capaz de convertir la señal eléctrica en una indicación de la concentración del analito, y en el que el reactivo (5) luminiscente está montado en el transductor.
2. Un dispositivo (1) de detección química de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la luminiscencia puede interrumpirse mediante el analito, aumentando de este modo la generación de calor (7), aumento en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito.
3. Un dispositivo (1) de detección química de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la luminiscencia puede potenciarse mediante el analito, disminuyendo de este modo la generación de calor (7), disminución en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito.
4. Un dispositivo de detección química (I) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el reactivo (5) luminiscente puede interconvertirse entre dos formas químicas que tienen unas propiedades de luminiscencia diferentes por reacción o combinación con el analito.
5. Un dispositivo (1) de detección química según se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que el reactivo (5) luminiscente se adsorbe sobre, se atrapa dentro de o se inmoviliza sobre un material de soporte.
6. Un dispositivo (1) de detección química según se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que el reactivo (5) luminiscente es un reactivo fluorescente.
7. Un dispositivo (1) de detección química según se reivindica en cualquier reivindicación anterior, que además comprende un reactivo adicional que es capaz de reaccionar con un segundo analito para cambiar la concentración local del primer analito, modificando de este modo la luminiscencia del reactivo (5) luminiscente para proporcionar una indicación de la concentración del segundo analito.
8. Un dispositivo (1) de detección química de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el primer analito es oxígeno, el segundo analito es glucosa y el segundo reactivo es glucosa oxidasa.
9. Un dispositivo (1) de detección química según se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que el reactivo (5) luminiscente es una combinación de un componente de absorción de luz y un componente luminiscente, en el que el componente de absorción de luz absorbe luz y entonces excita indirectamente el componente luminiscente mediante una transferencia de energía.
10. Un procedimiento para detectar un analito, que comprende irradiar al menos un reactivo (5) luminiscente para inducir la luminiscencia, exponer el reactivo luminiscente a una muestra, en el que, en presencia del analito, la luminiscencia está modificada por el analito, cambiando de este modo la cantidad de calor (7) generado, cambio en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito, realizar una transducción del cambio de calor en una señal eléctrica, usando un transductor que tiene un elemento (2) piroeléctrico o piezoelectrico y unos electrodos (3, 4), y convertir la señal eléctrica en una indicación de la concentración del analito, en el que el reactivo (5) luminiscente está montado en el transductor.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el analito interrumpe la luminiscencia del reactivo (5) luminiscente, aumentando de este modo la generación de calor (7), aumento en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el analito potencia la luminiscencia del reactivo (5) luminiscente, disminuyendo de este modo la generación de calor (7), disminución en la generación de calor que es proporcional a la concentración del analito.
13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el analito convierte el reactivo (5) luminiscente de una forma química a otra forma química, en el que las dos formas químicas tienen unas propiedades de luminiscencia diferentes.
14. Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que un segundo reactivo reacciona con un segundo analito para cambiar la concentración local del primer analito, modificando de este modo la luminiscencia del reactivo (5) luminiscente para proporcionar una indicación de la concentración del segundo analito.



Figura